

JOSMAR RODRIGUES DA ROCHA

**Planejamento de Inibidores das Enzimas Gliceraldeído-3-fosfato
Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi***

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

Área de concentração: Físico-química

Orientador: Prof. Dr. Albérico Borges
Ferreira da Silva

São Carlos

2010

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, ____/____/____

Josmar Rodrigues da Rocha

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e à minha esposa Adriane.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa Adriane, pelo amor, compreensão, paciência (muita) em todos os momentos.

Ao prof. Dr. Albérico Borges Ferreira da Silva por ter possibilitado que eu desenvolvesse um trabalho diferente do proposto inicialmente sob orientação do prof. Dr. Carlos Alberto Montanari.

Ao prof. Montanari por ter confiado em mim e ter me desafiado cientificamente várias vezes com o objetivo de contribuir para minha formação como pesquisador. Além disso, pelas longas discussões e o compartilhamento de sua experiência de mais de 25 anos no meio acadêmico. Nós todos entendemos que ele “só está fazendo seu papel...” e no final, sempre acabamos muito gratos por isso.

Ao prof. Dr. Roberto Luis Haiduke (IQSC) e à profa. Dra. Maria Cristina Nonato (FCFRP-USP) pelas contribuições e sugestões dadas para o aprimoramento deste trabalho.

Ao doutorando Matheus Pinto Pinheiro do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP, por ter contribuído com a obtenção das estruturas cristalográficas dos inibidores da TcDHODH através da nossa colaboração profa. Dra. Maria Cristina Nonato.

Aos meus amigos de longa data Helton Wiggers e Juliana Cheleski pelo companheirismo e apoio durante todo o tempo que nos conhecemos.

Aos meus amigos Renato Ferreira de Freitas, Igor Prokopczyk, Vinicius Sciuti, Geraldo Rodrigues Sartori, Renato Bauab, prof. Dr. Fábio Alberto de Molfetta (UFPA) e prof. Dr. Francisco da Chagas Alves Lima (UFPI) não só por terem contribuído de alguma forma para a realização deste trabalho, mas principalmente pelos momentos agradabilíssimos de convivência e das confraternizações de grupo.

À Malu, pelas conversas descontraídas.

A todos os demais membros do grupo NEQUIMED-PN.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo apoio financeiro (Processo nº 142154/2005-9).

EPÍGRAFE

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

RESUMO

A Doença de Chagas, causada pelo parasito tripanossomatídeo *Trypanosoma cruzi*, é endêmica e se distribuí por toda América Latina. É uma das parasitoses mais negligenciadas pela indústria farmacêutica e os únicos fármacos disponíveis para seu tratamento foram introduzidos há décadas. Infelizmente, eles são ineficientes e apresentam sérios efeitos colaterais. Esse panorama mostra a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos para a quimioterapia contra a doença de Chagas.

As enzimas pertencentes a vias metabólicas essenciais para a sobrevivência do parasito tais como a via glicolítica e a de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas, têm sido propostas como alvos interessantes no planejamento novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.

Neste trabalho, as enzimas Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH) e a Diidroorotato desidrogenase (TcDHODH) de *Trypanosoma cruzi* foram estudadas como alvos para o planejamento de inibidores enzimáticos com propriedades físico-químicas e características estruturais similares à de compostos-líderes. Para isso, foram utilizados métodos e ferramentas de Quiminformática tanto baseadas nas estruturas dos ligantes (LBVS) quanto dos receptores (SBVS).

Para a identificação e seleção de potenciais inibidores da enzima GAPDH, uma coleção virtual obtida do banco de dados ZINC, contendo aproximadamente 2,5 milhões de compostos, foi avaliada através de vários filtros de seleção com o objetivo de priorizar aqueles compostos mais interessantes do ponto de vista estrutural, de propriedades físico-químicas e farmacocinéticas. A aplicação desses filtros originou uma subcoleção de aproximadamente 450 mil estruturas que foram avaliadas segundo a complementaridade de interações com a estrutura da enzima através de métodos de docagem molecular. Com base nestes resultados, doze compostos que se mostraram promissores foram selecionados e adquiridos comercialmente para serem testadas *in vitro* contra a enzima TcGAPDH.

Dos doze compostos testados, três exibiram afinidade (K_i) pela enzima em concentrações inferiores a 80 μM . Além disso, esses compostos também são caracterizados pelo baixo peso molecular (274 a 330 g mol^{-1}) e no máximo 24 átomos diferentes do hidrogênio e, como consequência, apresentam eficiências do ligante entre 0,24 e 0,34 $\text{Kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$, o que os tornam ótimos candidatos à otimização molecular visando aumento da afinidade pelo alvo.

Para a busca de inibidores da enzima TcDHODH, primeiramente foi realizada uma busca por cavidades na estrutura 3D do alvo para a identificação de regiões

distintas do sítio catalítico e passíveis de serem exploradas no planejamento de ligantes. Através desta análise foi possível o estabelecimento de quatro novas regiões com forma, volume e localizações adequadas para acomodar pequenas moléculas capazes de modular a atividade da TcDHODH. Uma destas regiões, chamada S2, localizada sob a alça β 4- α A e no canal de acesso dos substratos ao sítio ativo, foi escolhida para o planejamento baseado na estrutura do alvo.

As estruturas de aproximadamente cem compostos derivados de pirimidinas, substituídos em posições estrategicamente definidas e selecionados através de buscas por subestruturas, foram docadas no sítio de interesse e nove compostos adquiridos e testados *in vitro* contra a enzima com o objetivo de validar as hipóteses estabelecidas inicialmente. Destes, cinco compostos mostraram potências (IC_{50}) superiores à do produto de reação (inferior a 150 μ M),

Os resultados encontrados validaram as hipóteses geradas na primeira etapa e foram usados para direcionar a seleção de outras quinze novas moléculas através de um protocolo de docagem molecular com ajuste induzido. A avaliação *in vitro* desses compostos contra a enzima TcDHODH resultou na identificação de outros 11 compostos ativos, dos quais o mais potente exibiu afinidade pela enzima em concentração igual a 124 nM. Este composto possui eficiência do ligante igual a 0,56 Kcal mol⁻¹ átomo⁻¹ e pode ser considerado um fragmento molecular com excelentes características do ponto de vista do potencial para futuro desenvolvimento como agente terapêutico.

Os resultados encontrados também evidenciaram a importância de determinadas características estruturais impressas nos inibidores da TcDHODH para a complementaridade com o novo sítio de interação identificado. Assim, novos compostos foram propostos para otimização molecular com o objetivo de melhorar afinidade e aumentar a diversidade de classes e, deste modo, ampliar o espectro de perfis farmacocinéticos para posteriores ensaios celulares e *in vivo*,

Através da realização deste trabalho foi possível validar as estratégias adotadas na utilização dos métodos computacionais e também as hipóteses construídas a partir da aplicação dos mesmos. A taxa de acerto (TA) alcançada foi superior a 30% no planejamento de inibidores para ambos os alvos, ou seja, muito superiores às encontradas em experimentos de ensaio em massa. Deste modo, este estudo contribuiu com a proposição de novos esqueletos moleculares que podem ser usados como compostos-líderes no desenvolvimento de novos agentes tripanocidas focando nas enzimas TcGAPDH e TcDHODH como alvos.

ABSTRACT

Chagas' disease, an endemic illness widely distributed throughout Latin America, is caused by the protozoa parasite *Trypanosoma cruzi*. It is one of the tropical diseases that are among the most neglected by the pharmaceutical industry, for which available treatments were launched more than 30 years ago. In addition, these drugs are ineffective and cause severe side effects to patients. This panorama shows the need for the development of new and more effective chemotherapeutic agents for the treatment of the disease.

Enzymes belonging to metabolic pathways that are essential for the parasite survival such as the glycolysis and pyrimidine nucleotide biosynthesis have been proposed as attractive targets for the design of new drugs for the treatment of Chagas disease.

In this work, the enzymes Gyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH) and the Dihydroorotate dehydrogenase (TcDHODH) from *Trypanosoma cruzi* were studied as targets for the design of inhibitors with physicochemical properties and structural characteristics similar to lead-compounds. Methods in Cheminformatics within the Ligand- and Structure-based Virtual Screening (LBVS and SBVS, respectively) approaches were thoroughly employed as tools to identify new hits.

For the selection and identification of potential inhibitors of the GAPDH enzyme, a compound database containing nearly 2.5 million of small molecules retrievable from ZINC was evaluated through several molecular filters aiming at prioritizing those compounds more interesting from the point of view of their structures, physicochemical and predicted ADME/Tox properties. The application of Filter originated a subcollection of approximately 450 thousand structures that were then scored according to their complementary interactions with the 3D structure of the enzyme through molecular docking. Based on docking results, twelve compounds that showed to be promising ligands were selected and commercially acquired for *in vitro* assays against the TcGAPDH.

Of the twelve compounds evaluated *in vitro*, three exhibited affinity constants (K_i) at concentrations lower than 80 μM . Furthermore, the selected compounds are also characterized by the low molecular weight (274 to 330 g mol^{-1}) and a maximum of non-hydrogen atom count of 24, as a result, they have Ligand Efficiencies between 0,24 and 0,34 $\text{Kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$, what grant them great potential as candidates for molecular optimization and potency improvement.

For the search of TcDHODH inhibitors, cavities in the 3D structure of the target for the identification of areas apart from catalytic site but likely to be explored

in the design of ligands were selected *a priori*. This resulted in four new regions with appropriate shape, volume and locations to accommodate small molecules capable of modulating the activity of TcDHODH. One of the areas, called S2 site, is located under the $\alpha 4$ - βA loop and in the access channel of the substrate to the active site and was chosen to be explored in the SBDD studies.

Approximately one hundred of pyrimidine derivatives containing strategically defined positions for molecular substitution were retrieved from commercially available compounds database through substructure searching and docked into the previously defined site. Based on the docking results nine compounds were selected, purchased and assayed *in vitro* against the enzyme with the objective of validating the hypothesis. Of these, five compounds showed potencies (IC_{50}) better than that exhibited by the product of the reaction (values lower than 150 μM).

Thus, the results found validated the hypotheses generated in the first stage of the designing and they were used to drive the selection of other fifteen new molecules through induced fit molecular docking protocol. The *in vitro* evaluation of those compounds against the TcDHODH enzyme resulted in the identification of other eleven ligands, of which the most potent exhibited affinity for enzyme at the concentration of 124 nM. This molecule has a Ligand Efficiency of 0.56 $Kcal\ mol^{-1}\ atom^{-1}$ and can be considered a fragment-like compound with excellent characteristics from the point of view of its potential for future development as therapeutic agent.

The results found also evidenced the importance of certain structural characteristics in the inhibitor of TcDHODH for the complementarily with the new identified site of interaction. Thus, new compounds were proposed for potency and class diversity improvement. By doing so we hope to enlarge ADME profile spectrum for further cellular and *in vivo* assays.

Through the success of this work, it was possible to validate the strategies adopted in the use of computational methods and also the hypotheses built from the application of that. The success rate (TA) obtained was higher than 30% in the design of ligands for both studied targets, which is much better than that usually found along High Throughput Screening assays. Thus, this study contributed with the proposition of new molecular scaffolds that can be used as lead compounds in the development of new tripanocidal agents having as targets the enzymes TcGAPDH or TcDHODH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.....	30
Figura 1.2 - Etapas de identificação, seleção e otimização de substâncias bioativas durante o processo de descoberta de novos fármacos (Fase Pré-clínica).....	31
Figura 1.3 - Representação do espaço químico e do espaço químico-biológico. Os compostos terapeuticamente úteis se agrupam formando regiões delimitadas pelas elipsóides, as quais representam diferentes classes de alvos terapêuticos.....	36
Figura 1.4 - Diagrama esquemático para a utilização dos diferentes métodos de ensaios virtuais.....	39
Figura 2.1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas, doença do sono e da leishmaniose	57
Figura 2.2 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> no inseto vetor e em humanos e outros mamíferos	58
Figura 2.3 - Fármacos utilizados atualmente no tratamento da doença de Chagas..	60
Figura 2.4 - Derivados de triazóis inibidores da enzima C14 α -sterol demetilase	62
Figura 2.5 - Estrutura do composto K-777, potente inibidor da enzima Cruzaína	63
Figura 2.6 - Estruturas moleculares da Tripanotona e dos inibidores da enzima Tripanotona retutase Tioridazina e a Clomipramina	64
Figura 2.7 - Estrutura química dos nucleotídeos. (a) bases nitrogenadas: Parte superior bases purínicas; parte inferior bases pirimidínicas. (b) estrutura química de um nucleotídeo monofosfato	65
Figura 2.8 - Estrutura molecular do Allopurinol	66
Figura 3.1 - Representação simplificada da fosforilação oxidativa do D-Gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-Bisfosfoglicetato (1,3-BPG).....	79

Figura 3.2 - Mecanismo da reação da enzima GAPDH: Após a formação do complexo enzima-substrato (1) ocorre a formação de uma ligação covalente hemitioacetil (2) entre o substrato e o grupo –SH do resíduo de Cisteína, facilitada pela catálise ácido-base com uma base vizinha, a His194. (3) Esse intermediário enzima-substrato é oxidado pelo NAD⁺ ligado no sítio ativo, formando um intermediário covalente acil-enzima, um tioéster. (4) o NADH formado deixa o sítio ativo e é substituído por outra molécula de NAD⁺. A ligação entre o grupo acil e o grupo tiol da enzima tem uma alta energia livre de hidrólise. (5) Essa ligação sofre uma fosforilação (ataque pelo P_i), liberando o produto 1,3-BPG 80

Figura 3.3 - Representação em fita das (a) quatro cadeias da enzima GAPDH e (b) dos domínios dos cofatores NAD⁺(laranja) e catalíticos (azul). Figura gerada com o programa Chimera..... 81

Figura 3.4 - (a) Representação bidimensional da distribuição e localização dos sítios P_s e P_i e novo P_i da enzima GAPDH e (b) posições alternadas adotadas pelo substrato durante a catálise (mecanismo *flip-flop*)..... 82

Figura 3.5 - Estruturas representativas das classes de inibidores irreversíveis da GAPDH de *T. cruzi* 83

Figura 3.6 - Estruturas representativas das classes de inibidores reversíveis da GAPDH de *T. cruzi* 86

Figura 3.7 - Reação de óxido-redução catalisada pela enzima TcDHODH 88

Figura 3.8 - Mecanismo da reação catalisada pela enzima TcDHODH: (1) O DHO é convertido a ORO através da abstração do próton H_{5a} pela Cys130 e transferência do hidreto H₆ ao nitrogênio N₅ do FMN e (2) na segunda metade da reação a transferência de um hidreto (H⁻) pelo FMN aniônico e a de um próton pela Cys130 ao agente oxidante (FUM) é facilitada pela separação de cargas parciais induzida entre os carbonos C₂ e C₃ do mesmo devido a quebra na uniformidade de distribuição dos elétrons- π provocada por uma torção na ligação entre estes dois átomos, esta por sua vez é estabilizada pela interação do oxigênio carboxílico com a Lys43 89

Figura 3.9 - Posicionamento do DHO e do FMN dentro do sítio ativo da TcDHODH 91

Figura 3.10 - Estruturas tridimensionais de DHODHs pertencentes às classes 1 e 2. (a) LIDHODHA e (b) HsDHODH. Ambas as proteínas enovelam-se um motivo do tipo barril α/β . A TcDHODH é dimérica enquanto HsDHODH é monomérica	92
Figura 3.11 - Estruturas da (a) Leflunomida, fármaco que tem como alvo a HsDHODH e (b) dos compostos 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato, os únicos inibidores conhecidos da Família 1 de DHODHs.....	93
Figura 5.1 - Esquema estratégico adotado para o planejamento de novos inibidores da enzima GAPDH	108
Figura 5.2 - Inibidores complexados com as estruturas da enzima TcGADPH depositadas no PDB. (a) BRZ; (b) CYX; (c) S70.....	117
Figura 5.3 - Evolução de um ligante a composto-líder segundo suas características moleculares. Quanto mais à esquerda do gráfico maior a tratabilidade química de um ligante.....	120
Figura 5.4 - (a) ligante e (b) composto-líder da série planejada por Gelb <i>et al</i>	121
Figura 5.5 - Mapa de interações da molécula S70 com o sítio ativo da TcGAPDH na estrutura 1QXS, Figura gerada com o programa MOE	122
Figura 5.6 - (a) Representação da estrutura da TcGAPDH através da superfície de van der Waals. Regiões distantes até 4 Å dos compostos S70 e NAD ⁺ foram coloridas em verde e azul, respectivamente, para representar a extensão das cavidades ocupadas por cada um; a superfície da Cys166 está colorida em amarelo e serve como referência na análise (b) A representação da superfície de van der Waals do cofator revela o papel do mesmo na formação de uma cavidade mais bem definida para interação do ligante, fato que também mesmo ocorre para a interação do substrato.....	123
Figura 5.7 - Alinhamento das sequências primárias das enzimas TcGAPDH e HsGAPDH, Os resíduos do sítio ativo que podem ser explorado para se obter seletividade entre as duas enzimas estão marcados com traço verde. Alinhamento gerado no servidor on-line ESript.....	125

Figura 5.8 - Alinhamento tridimensional das enzimas TcGAPDH (azul) e HsGAPDH (cinza). Os resíduos do sítio ativo que podem ser explorados para seletividade são indicados em vermelho. Figura gerada com o programa Chimera	125
Figura 5.9 - Representação do uso da linguagem SMARTS implementada no programa Filter: “*” representa o padrão “qualquer átomo exceto hidrogênio”; “h0” representa “somente um átomo de hidrogênio”	129
Figura 5.10 - Distribuições de algumas das propriedades antes (vermelho) e após (preto) a filtragem utilizando-se o programa Filter	131
Figura 5.11 - Sobreposição da pose adotada pela molécula S70 (vermelho) na estrutura cristalográfica com as poses obtidas através da redocagem (amarelo) utilizando-se os programas (a) FlexX e (b) Fred.....	136
Figura 5.12 - Processo de autoescalamento das energias obtidas através de funções de pontuação de diferentes programas para a análise consensual.....	137
Figura 5.13 - Perfis de agrupamentos (a) desejados e (b) indesejados de interações moleculares	140
Figura 5.14 - Estrutura molecular do grupo diaminotriazina.	141
Figura 5.15 – Em a.1 e b.1 são mostradas as estruturas moleculares de dois dos doze compostos selecionados para ensaio contra a TcGAPDH; nas coluna 2 são mostradas as poses adotadas pelos respectivos compostos dentro da cavidade onde se localiza o ligante S70 (em varetas vermelhas) na estrutura 1QXS, representada pela superfície de van der Waals com a região da Cys166 em amarelo e do cofator de acordo com os átomos constituintes. A coluna 3 se distingue da coluna dois apenas pela representação dos ligantes através de suas superfícies van der Waals	142
Figura 5.16 - Grupos frequentemente reconhecidos por resíduos de Cisteína ativadas. Os círculos em laranja indicam onde ocorre o ataque nucleofílico por Cisteínas ativadas	144

Figura 5.17 - Análise bidimensional das interações preditas para os compostos (a) 8, (b) 10 e (c) 11 com o sítio da TcGAPDH;	145
Figura 5.18 - Moléculas análogas ao composto 11 encontrados como resultado da busca no banco de dados EMOLECULES.....	147
Figura 6.1 - Esquema estratégico adotado para o planejamento de novos inibidores da enzima TcDHODH.....	158
Figura 6.2 - Padrões SMARTS utilizados na busca por análogos substituídos do ORO no banco de dados ZINC. “h0”: apenas 1 átomo hidrogênio conectado; “A”: qualquer átomo diferente de hidrogênio conectado; “R5”: o átomo de carbono deve fazer parte de um anel de cinco membros	159
Figura 6.3 - Alinhamento entre as sequências primárias dos monômeros das enzimas TcDHODH e HsDHODH utilizando software ESript 2.2.	168
Figura 6.4 - Representação em fitas das estruturas alinhadas das enzimas (a) HsDHODH e (b) TcDHODH. O domínio N-terminal presente na estrutura da enzima humana e ausente na do T. cruzi está colorido em laranja	169
Figura 6.5 - Mapa de interações do complexo (a) Oxonato-TcDHODH (2E6F) e (b) Orotato-HsDHODH (2FPV). Resíduos com identidade ou características de interação conservadas estão marcados com os círculos de mesma cor nas duas figuras. Figura gerada no programa PoseView	170
Figura 6.6 - Método baseado em grade 3D utilizado pelo programa SiteID para identificação de sítios de interação	172
Figura 6.7 - Representação da localização das cavidades encontradas pelo programa SiteID: para (a) TcDHODH e (b) HsDHODH, representadas em fitas e pela superfície de van der Waals. Cada cavidade está indicada pelo respectivo código e a alça ativa (α 4- β A) colorida em laranja	172
Figura 6.8 - Representação esquemática das posições relativas entre a molécula de ORO e os sítios de interação encontrados pelo programa SiteID. As linhas cheias e	

pontilhadas indicam cavidades expostas e não-expostas ao solvente, respectivamente; a alça ativa (α 4-Ba) está indicada em vermelho..... 175

Figura 6.9 - Cinco dos nove compostos selecionados através da docagem molecular para o teste *in vitro*. A numeração dos compostos segue a mesma da Tabela 6.8 178

Figura 6.10 - Mapa de interações dos compostos (a) 3 e (b) 11 com o sítio ativo da LmDHODH..... 179

Figura 6.11 - Docagem molecular com ajuste induzido no sítio ativo da enzima TcDHODH. (a) molécula 5-fluoroorotato em azul; (b) molécula 5-aminoorotato em laranja 182

Figura 6.12 - Exemplos de moléculas com diferentes substituintes no anel pirimidinona selecionados para o Ensaio Virtual utilizando o IFD..... 183

Figura 6.13 - Poses adotadas pelas duas moléculas com melhor perfil de interações entre os compostos selecionados para ensaio *in vitro* após a docagem com ajuste induzido. Moléculas selecionadas em azul; FMN na cor rosa e resíduos importantes em verde com indicação do código 183

Figura 6.14 - Esqueletos representativos dos compostos mais potentes identificados 185

Figura 6.15 - Exemplos de formas tautoméricas adotadas pelos inibidores mais potentes contra a enzima TcDHODH..... 185

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Enzimas envolvidas no controle da glicólise, cuja inibição individual leva a uma redução de 50% fluxo glicolítico	69
Tabela 3.1 - Resumo das características estruturais de diferentes classes de DHODHs disponíveis no PDB	92
Tabela 5.1 - Relação de softwares/banco de dados e suas aplicações dentro do processo de seleção de inibidores da enzima TcGAPDH	107
Tabela 5.2 - Alguns dos parâmetros mais importantes escolhidos para filtragem da coleção inicial de compostos utilizando o programa Filter	109
Tabela 5.3 - Estado de protonação definidos para os resíduos presentes na região preparada para o SBVS	109
Tabela 5.4 - Resumo dos parâmetros utilizados na construção do banco de dados multiconformacional	110
Tabela 5.5 - Parâmetros usados para a docagem molecular com o programa Autodock	113
Tabela 5.6 - Código PDB do modelo, parâmetros estruturais e ligantes complexados.	117
Tabela 5.7 - Parâmetros topológicos dos sítios do cofator e do substrato na enzima TcGAPDH.....	119
Tabela 5.8 - Estruturas moleculares e respostas biológicas dos compostos avaliados no teste <i>in vitro</i> contra a TcGAPDH	143
Tabela 6.1 - Relação de softwares/banco de dados e suas aplicações dentro do processo de seleção de inibidores da enzima TcDHODH.....	157
Tabela 6.2 - Parâmetros utilizados para a busca por cavidades com o programa SiteID	159

Tabela 6.3 - Parâmetros usados para preparação das estruturas 3D dos compostos docados na TcDHDOH	160
Tabela 6.4 - Estados de protonação definidos para os resíduos presentes na região preparada para o SBVS.....	160
Tabela 6.5 - Parâmetros usados para a docagem molecular com o programa Autodock.....	162
Tabela 6.6 - Parâmetros utilizados para a docagem através do protocolo IFD	165
Tabela 6.7 - Código PDB do modelo, parâmetros estruturais e ligantes complexados	166
Tabela 6.8 - Moléculas selecionadas através da docagem molecular juntamente com o Oxonato e valores de energia correspondentes	177
Tabela 6.9 - Parâmetros cristalográficos obtidos para as estruturas dos complexos dos compostos 3 e 11 com a enzima LmDHODH	179

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
Asn	Resíduo de aminoácido Asparagina
Asp	Resíduo de aminoácido Aspartato
C α	Carbono conectado à primeira posição após o grupo funcional
Cys	Resíduo de aminoácido Cisteína
DCIP	Dicloroindofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.C.	Classificação numérica de enzimas do <i>Enzyme Commission</i> baseada nas reações que elas catalisam
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
G3P	Gliceradeído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
Gln	Resíduo de aminoácido Glutamina
Glu	Resíduo de aminoácido Glutamato
Gly	Resíduo de aminoácido Glicina
His	Resíduo de aminoácido Histidina
HTS	Ensaio Automatizado em Larga Escala
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da atividade
IND	Investigação de Novo Fármaco
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K _i	Constante inibitória
LBDD	Planejamento baseado na estrutura do ligante

LD ₁₀₀	Concentração necessária para inibir o crescimento do parasito em 100%
LE	Eficiência do Ligante
LGA	Algoritmo Genético Lamarkiano
<i>Log P</i>	Logaritmo do coeficiente de partição em octanol/água
Lys	Resíduo de aminoácido Lisina
MW	Peso molecular
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzida
NCE	Nova Entidade Química
NDA	Requisição de um Novo Fármaco
PDB	Banco de Dados de Proteínas
PSA	Área superficial polar
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Raiz Quadrada do Desvio Médio
Ser	Resíduo de aminoácido Serina
SBDD	Planejamento Baseado na Estrutura do Alvo
TA	Taxa de acerto
TEA	Trietanolamina
Thr	Resíduo de aminoácido Treonina
UMP	Uridina Monofosfato
USP	Universidade de São Paulo

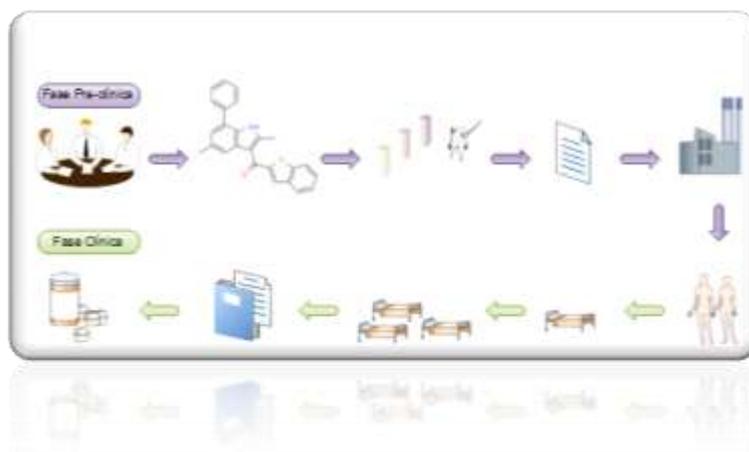
CONTEÚDO

<i>Capítulo 1</i>	27
O Planejamento de Fármacos	27
1.1. A Química Medicinal e a gênese planejada de fármacos	29
1.2. As três principais fases da ação dos fármacos	33
1.3. O espaço químico-biológico	35
1.4. A Quiminformática na identificação e otimização de ligantes	36
1.4.1. Ensaio Virtuais	37
1.4.1.1. Docagem molecular	40
1.4.1.2. Aspectos Práticos da docagem molecular	44
1.5. Conclusões	48
1.6. Referência	49
<i>Capítulo 2</i>	55
A Doença de Chagas	55
2.1. Descrição e panorama atual da doença de Chagas	57
2.2. Ciclo de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
2.3. Manifestações clínicas	59
2.4. Tratamento	59
2.5. Vias metabólicas alvos de novos agentes quimioterápicos	61
2.5.1. Via de biossíntese de ergosterol.....	62
2.5.2. Via de digestão proteolítica.....	63
2.5.3. Via de síntese e metabolismo da Tripanotona	64
2.5.4. Biossíntese de Nucleotídeos	65
2.5.4.1. Via de salvação de purinas	66
2.5.4.2. Via de síntese de novo de pirimidinas.....	67
2.5.5. Via glicolítica	68
2.6. Conclusões	70
2.7. Referências	70
<i>Capítulo 3</i>	77
Alvos enzimáticos	77
3.1. Enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	79
3.1.1. Reação e mecanismo	79

3.1.2.	Estrutura.....	80
3.1.3.	Inibidores irreversíveis.....	83
3.1.4.	Inibidores reversíveis	85
3.2.	Enzima Diidroorotato desidrogenase	87
3.2.1.	Reação e mecanismo.....	87
3.2.2.	Estrutura.....	90
3.2.3.	Inibidores.....	93
3.3.	Conclusões	94
3.4.	Referências	94
<i>Capítulo 4</i>	101
Objetivos		101
<i>Capítulo 5</i>	105
Planejamento de inibidores da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ..		105
5.1.	Materiais e métodos	107
5.2.	Resultados e discussão.....	116
5.2.1.	Análise das estruturas tridimensionais da enzima GAPDH.....	116
5.2.2.	Análise do sítio ativo	124
5.2.3.	Coleção de compostos com propriedades adequadas.....	126
5.2.3.1.	<i>Banco de dados</i>	126
5.2.3.2.	<i>Filtros de Seleção</i>	127
5.2.4.	Docagem consensual.....	132
5.2.5.	Seleção dos compostos e ligantes identificados	138
5.2.6.	Proposta de novos inibidores	146
5.3.	Conclusões	148
5.4.	Referências	149
<i>Capítulo 6</i>	155
Planejamento de inibidores da enzima Diidroorotato desidrogenase		155
6.1.	Materiais e métodos	157
6.2.	Resultados e discussões.....	166
6.2.1.	Análise das estruturas tridimensionais da enzima DHODH.....	166
6.2.2.	Análise do sítio	167
6.2.3.	Novas hipóteses para o planejamento de inibidores da TcDHODH ..	171
6.2.4.	Coleção de compostos e ensaio virtual	174

6.2.5. Seleção dos compostos e ligantes identificados.....	176
6.2.6. Docagem com ajuste induzido.....	180
6.3. Conclusões.....	187
6.4. Referências.....	188
<i>Capítulo 7.....</i>	<i>191</i>
Conclusões e perspectivas	191
7.1. Conclusões	193
7.2. Perspectivas	193
APÊNDICE A.....	195

Capítulo 1



O Planejamento de Fármacos

Neste capítulo são discutidos os fundamentos do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, e um dos papéis da Química Medicinal dentro dessas etapas através da utilização de métodos *in silico* para a identificação e otimização de compostos bioativos.

1.1. A Química Medicinal e a gênese planejada de fármacos

A descoberta de novos agentes terapêuticos é um processo longo, de alto custo e que envolve diversas áreas do conhecimento. A Química desempenha um papel fundamental dentro deste processo através de uma subárea chamada Química Medicinal. Esta, por sua vez, é uma ciência interdisciplinar que cobre um amplo domínio situado na interface da química orgânica com as ciências da vida, tais como a bioquímica, farmacologia, biologia molecular, imunologia, farmacocinética e a toxicologia, de um lado, e disciplinas baseadas na química tais como a Físico-química, Cristalografia, Espectroscopia e métodos de Modelagem Molecular computacional do outro.¹

O objetivo da Química medicinal é planejar e produzir compostos químicos que possam ser usados na medicina para a prevenção, tratamento ou cura de doenças humanas ou animais. Além disso, os estudos também podem envolver fármacos já existentes, suas propriedades farmacológicas e as relações entre a estrutura química e suas atividades biológicas (do inglês, *Structure-Activity Relationships - SARs*). A definição oficial de Química Medicinal dada por uma comissão especializada da IUPAC é:²

*"A Química Medicinal envolve a **descoberta**, o **desenvolvimento** e a **identificação** e **interpretação** do modo de ação de compostos biologicamente ativos ao nível molecular. A ênfase é colocada em fármacos, mas o interesse da Química Medicinal também está voltado para o estudo, identificação e síntese de seus produtos metabólicos bem como dos compostos relacionados."*

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos englobado pela Química Medicinal é dividido em duas grandes fases, como mostrado na Figura 1.1: Fase Pré-clínica (descoberta) e Fase clínica (desenvolvimento).

A Fase pré-clínica inicia com identificação da necessidade de uma nova terapia e o julgamento sobre a adequação dos tratamentos existentes (se existirem). Desta análise, juntamente com a avaliação do conhecimento sobre a doença alvo, surgem as hipóteses de como será possível melhorar a terapia, ou seja, quais fatores em termos de segurança, eficácia ou mecanismo de ação serão aperfeiçoados e trarão benefícios para os portadores da doença em estudo. Com base nessas hipóteses serão estabelecidos os objetivos específicos do projeto. Então, o teste de compostos

químicos selecionados em modelos biológicos apropriados (e.g., enzimas, DNA, receptores, células) pode começar. Os passos subsequentes incluem a identificação de substâncias químicas que apresentam atividade biológica *in vitro* relevante, chamados de ligantes (do inglês, *hits*), e o teste de compostos análogos em modelos *in vivo*. Após isso, é feita a síntese de estruturas análogas para a maximização das atividades e finalmente a seleção de um ou mais compostos, chamados compostos-líderes (do inglês, *lead compound*), como candidatos para o desenvolvimento do fármaco. Estes candidatos passam por avaliações toxicológicas em animais e se forem aprovados em todos os testes, os dados acumulados da pesquisa são reunidos e submetidos na forma de um Comunicado Especial (CE) à ANVISA, ou como uma solicitação de registro para Investigação de um Novo Fármaco (*IND*, do inglês, *Investigational New Drug*) ao FDA. Uma vez que a autorização para as pesquisas é concedida, há a necessidade da síntese em larga escala dos candidatos a fármacos para possibilitar os estudos de formulação, avaliações sobre o uso a longo prazo em animais e os estudos das fases clínicas.^{3,4}

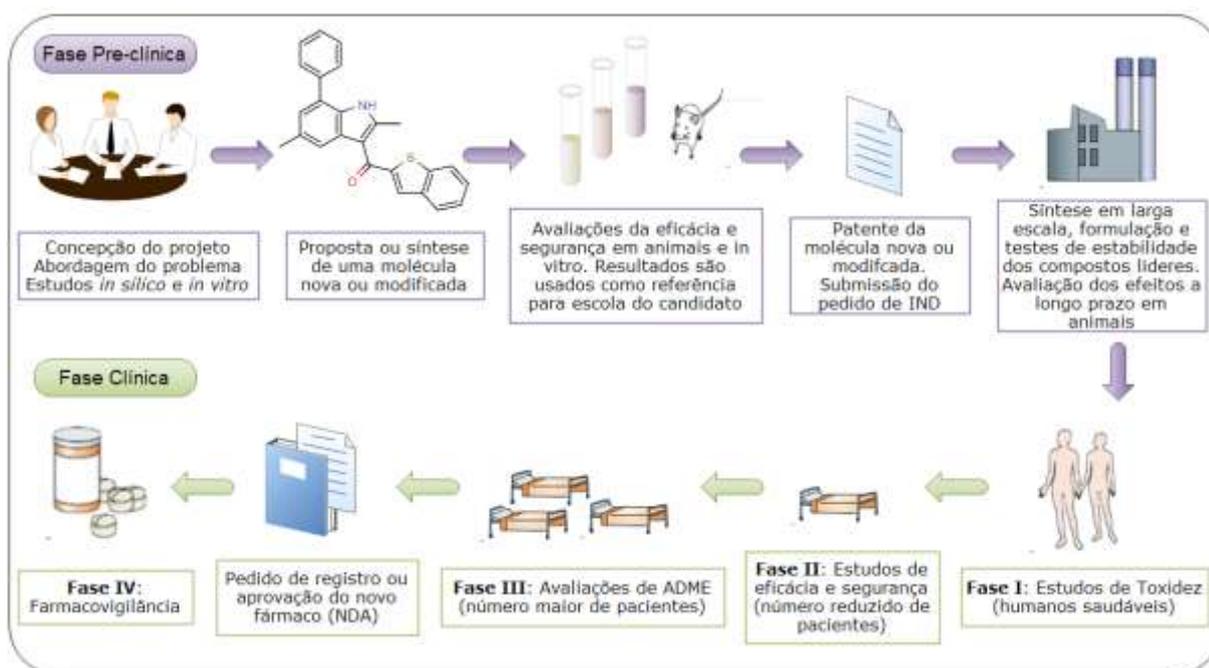


Figura 1.1 - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos³

Na fase clínica, a proposta é o aperfeiçoamento das propriedades farmacocinéticas e o ajuste fino das propriedades farmacêuticas (formulação química) das substâncias selecionadas para que estas se tornem aptas ao uso clínico. Para que isto seja possível são feitas avaliações sequenciais da tolerância

em voluntários humanos saudáveis (Fase I), da eficácia e segurança em pacientes (Fase II) seguidas de uma ampla avaliação em milhares de pacientes para a compilação de dados acerca da eficácia e de propriedades ADME (Fase III). Para os poucos candidatos a fármacos que sobrevivem a esta série de testes, todos dados acumulados durante a pesquisa são submetidos à ANVISA na forma de um pedido de Registro do novo Fármaco, ou de Aplicação como novo Fármacos (*NDA*, do inglês, *New Drug Application*), no caso do FDA. Todos os dados são revisados por especialistas das próprias agências e somente após a aprovação o fármaco pode ser prescrito pelos médicos aos pacientes para tratar a doença para a qual foi designado. Na fase clínica IV, são realizados os monitoramentos pós-comercialização dos novos fármacos.^{3,4}

Em geral, até que o processo alcance a Fase Clínica as pesquisas se concentram essencialmente na sequência de passos ilustrados na Figura 1.2, que são: (i) identificação, seleção e validação do alvo; (ii) identificação de ligantes; (iii) otimização dos ligantes a compostos-líderes (iv) otimização dos compostos-líderes.⁵

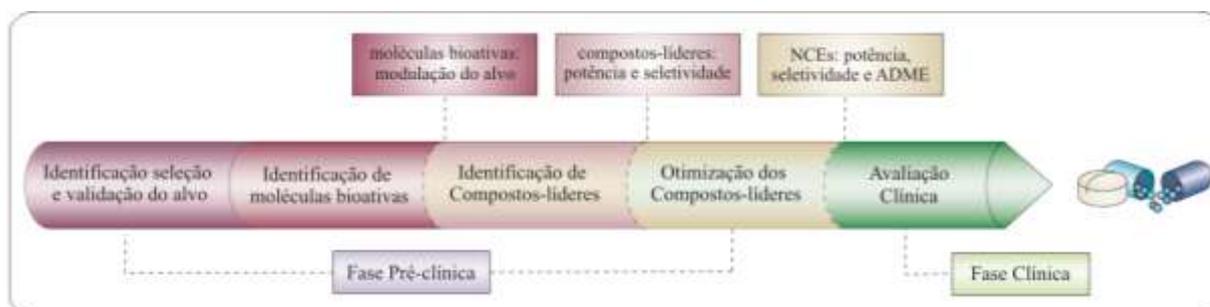


Figura 1.2 - Etapas de identificação, seleção e otimização de substâncias bioativas durante o processo de descoberta de novos fármacos (Fase Pré-clínica)⁵

(i) O conhecimento de alvos moleculares (e.g. enzimas, receptores, ácidos nucléicos) tem se beneficiado do progresso feito na biologia molecular, engenharia genética e na biologia estrutural. É crescente o número de alvos para os quais se conhece a estrutura 3D e a localização precisa do sítio ativo. Como consequência o planejamento de novas substâncias químicas bioativas é cada vez mais realizado com base nos resultados obtidos de estudos de modelagem receptor-ligante.¹ Além da identificação do alvo molecular, sua validação também é fundamental, pois estabelece a sua relevância no processo fisiopatológico em estudo e evidencia se a sua modulação seletiva é capaz de gerar a resposta farmacológica esperada no controle da doença ou desordem metabólica em humanos.^{5,6}

(ii) Os ligantes têm sua origem a partir de produtos naturais ou através de síntese orgânica e coleções combinatórias. Estas moléculas podem ser identificadas através de ensaios reais, virtuais (*in silico*) ou ainda através de *planejamento racional*, mas em todos os casos as suas propriedades biológicas devem ser determinadas experimentalmente para verificar suas capacidades de modulação do alvo de interesse. Nesta fase inicial geralmente são identificadas moléculas com baixa afinidade (e.g. 0,1-100 μM) que necessitam ser otimizadas em relação a uma série de propriedades (e.g., potência, afinidade, seletividade, biodisponibilidade, toxidez) até se tornarem compostos-líderes promissores.^{6,7}

(iii) Nem todos os ligantes possuem propriedades químicas e biológicas adequadas para serem considerados compostos-líderes. Primariamente, possuir alguma afinidade pelo alvo macromolecular confirmada é essencial, entretanto, desde a identificação dos ligantes pode-se priorizar compostos com características moleculares mais apropriadas do ponto de vista de acessibilidade sintética de análogos ou que possuam características físico-químicas mais compatíveis com o que já se conhece sobre o perfil necessário para aumentar a probabilidade de sucesso nas fases subsequentes da gênese do fármaco (vide seção 5.2.3 para um discussão mais detalhada). Os ligantes com características adequadas são selecionados como compostos-líderes e otimizados até que possuam potência maior, em geral em concentrações inferiores 100 nM contra o alvo macromolecular e abaixo de 100 μM contra o modelo *in vivo*.⁷

(iv) Na última etapa da Fase Pré-clínica, os compostos-líderes são aperfeiçoados em relação às propriedades farmacocinéticas e também é feito um ajuste fino das propriedades farmacêuticas (formulação química) para torná-los *novas entidades químicas* (do inglês, *New chemical Entities - NCEs*) aceitáveis ao uso na fase de desenvolvimento clínico até que alcancem a terapia.^{6,7}

Todas essas etapas demandam o conhecimento multidisciplinar englobado pela Química Medicinal juntamente com a integração de diversas tecnologias para a investigação e o entendimento dos efeitos das propriedades moleculares nas diferentes fases de ação de pequenas moléculas dentro e fora do organismo humano.

1.2. As três principais fases da ação dos fármacos

A ação de um dado fármaco depende de uma sequência de eventos físico-químicos que começa quando a molécula bioativa penetra no organismo vivo e termina quando a mesma é eliminada após ter alcançado seu alvo e provocado a resposta biológica apropriada. Classicamente é admitido que três fases características governam a atividade biológica de um fármaco dentro de um organismo vivo: as *fases farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica*.¹

A *fase farmacêutica*, algumas vezes chamada *fase biofarmacêutica*, envolve a escolha da via de administração apropriada e a formulação farmacêutica e tem como objetivo otimizar a distribuição e facilitar a absorção do medicamento. Algumas das possíveis rotas de administração são a oral, intravenosa, nasal, transdermal, etc. Na formulação é decidido se o composto irá ser administrado na forma de comprimidos, cápsulas, líquido, etc. Quando a formulação farmacêutica de um composto não é efetiva, modificações químicas sutis ou a formação de derivados biorreversíveis, ou seja, que podem ser facilmente convertidos pelo organismo aos compostos ativos (e.g. ésteres ou amidas), podem melhorar propriedades físico-químicas tais como lipofilia, pK_a , polaridade, e otimizar a taxa de dissolução nos fluidos biológicos e a passagem pelas primeiras membranas encontradas após sua administração (e.g. cutânea, intestinal, etc.). Deste modo, o resultado global é uma melhor absorção pelo organismo.¹

A *fase farmacocinética* controla os diferentes parâmetros que governam o caminho aleatório percorrido pelo fármaco desde a sua administração até o seu sítio de ação e assegura a sua eliminação após ter produzido o efeito farmacológico. Os sítios de ação dos fármacos são separados no espaço e tempo da região de administração ou absorção. Em ordem cronológica os eventos da fase farmacocinética ocorrem como segue: absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco, conhecidos simplesmente por ADME. Durante a absorção ele atravessa membranas biológicas e organelas. Esse processo é fortemente dependente das características físico-químicas do fármaco (ionizado, não ionizado, tamanho, coeficiente de partição, etc.) e pode ocorrer através de *difusão passiva* ou mecanismos fisiológicos mais sofisticados. A corrente sanguínea se encarrega de distribuí-lo pelo organismo. A função do metabolismo é transformar quimicamente os

fármacos ou qualquer outra substância estranha ao organismo (xenobióticos) em derivados solúveis em água para facilitar a sua eliminação através da urina. Esta mudança geralmente produz uma supressão da atividade farmacológica e da eventual toxidez. Entretanto, também pode acontecer de o metabolismo ativar um determinado composto ou mesmo produzir intermediários altamente reativos (a maioria eletrófilos) que induzem mecanismos de toxidez. Se for possível a ativação metabólica, fármacos inativos *in vitro* podem se mostrar ativos *in vivo* e este é o princípio de funcionamento dos chamados *pro-fármacos*. Uma vez que o efeito farmacológico é produzido, o fármaco e seus metabolitos devem ser eliminados do organismo com cinética apropriada. Um processo de eliminação muito lento produz a acumulação progressiva efeitos tóxicos. Por outro lado, uma eliminação muito rápida leva a necessidade de administração de várias doses e uma aceitação menor pelo paciente. As principais rotas de eliminação são a renal (urina) e retal (fezes), mas ocasionalmente também pode ocorrer por outras vias (e.g. pulmonar, salivar, cutânea).¹

Os quatro processos de ADME estão relacionados com a biodisponibilidade dos fármacos. Como a biodisponibilidade é expressa como a porcentagem do composto que alcança a corrente sanguínea em um determinado tempo, a administração intravenosa representa então, por definição, 100% de biodisponibilidade. Depois de uma dosagem oral, por exemplo, uma biodisponibilidade de 100 % implicaria na completa absorção e nenhum metabolismo de primeira passagem; tal situação é altamente improvável.¹

A *fase farmacodinâmica* é a fase de maior interesse para o químico medicinal e trata diretamente da natureza e da qualidade das interações entre o fármaco e seu alvo biomacromolecular. Partindo de um composto pouco potente e não seletivo, o desafio é maximizar a potência e minimizar os efeitos adversos causados pelo composto. A resposta biológica é máxima quando o princípio ativo exibe uma perfeita complementaridade estereoquímica e eletrônica com a estrutura do alvo. Idealmente, o químico medicinal, baseado nos conhecimentos das características do alvo, tenta planejar compostos que possuam tamanho, forma, propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas e a disposição dos grupos funcionais apropriadas. Quanto maior é o ajuste do composto com o sítio do alvo, mais seletivo será o fármaco em promover apenas a resposta biológica desejada. Por isso, a procura exaustiva

dentro do universo infinito de combinações entre os átomos por aqueles compostos capazes de interagir eficientemente com as biomacromoléculas envolvidas em processos importantes dentro do organismo é o ponto central do planejamento de fármacos.¹

1.3. O espaço químico-biológico

Como já discutido, a busca por NCEs e novos esqueletos químicos com aplicações na área terapêutica é o ponto central da química medicinal e do planejamento de fármacos. Tradicionalmente, identificar estas estruturas envolve trabalhos árduos de síntese orgânica sistemática (ou isolamento de produtos naturais) e ensaios biológicos de vários compostos. Todo este processo depende da exploração adequada do *espaço químico* para que seja possível selecionar aquelas moléculas com potencial para se tornarem bons compostos-líderes.

Com a evolução da química medicinal, tornou-se claro que mesmo os métodos mais eficientes de química combinatória são capazes de gerar apenas uma fração diminuta da diversidade química que define o espaço químico a ser varrido na busca por substâncias química bioativas.⁸ Hoje, estima-se que esse conjunto exceda 10^{20} compostos orgânicos, mesmo quando nos limitamos a aqueles com MW menores que 500 Da e que contêm os elementos tipicamente encontrados em fármacos, ou seja C, O, H, N, P, S, F, Cl, Br, I. Dada a vastidão do espaço químico, o desafio na descoberta de fármacos é localizar aquelas regiões nas quais é mais provável encontrar compostos biologicamente ativos. Os limites do espaço químico biologicamente relevante são definidos pelas interações específicas entre pequenas moléculas e os padrões de reconhecimento molecular tridimensionais de alvos biológicos tais como proteínas, RNA e DNA, que tem se desenvolvido ao longo de bilhões de anos.

Um século de química medicinal e milhares de ensaios em massa (do inglês, *High-Throughput Screening - HTS*) sugerem que os compostos que interagem com certas classes de alvos (e.g., GPCRs, Cinases, Proteases) estão agrupados em regiões discretas dentro do espaço químico como mostrado na Figura 1.3. Estas regiões podem ser definidas através do uso de descritores físico-químicos e topológicos dos compostos e são chamadas de *espaço químico-biológico*.^{8,9}

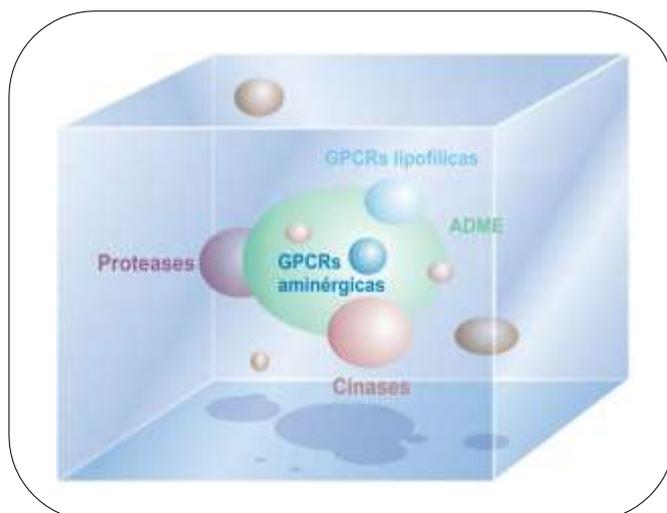


Figura 1.3 - Representação do espaço químico e do espaço químico-biológico. Os compostos terapeuticamente úteis se agrupam formando regiões delimitadas pelas elipsóides, as quais representam diferentes classes de alvos terapêuticos

Com base nisso, os estudos focados em planejamento de fármacos tem como um dos seus objetivos específicos a utilização de métodos computacionais ou experimentais que permitem “navegar” no *espaço-químico* e localizar aquelas regiões de *espaço químico-biológico* específicas para o alvo de interesse.

1.4. A Quiminformática na identificação e otimização de ligantes

A exploração sistemática do *espaço químico* e o delineamento das regiões estabelecidas pelo *espaço químico-biológico* só são possíveis através da criação de bancos de dados *in silico* para o armazenamento adequado das informações sobre as pequenas moléculas e os alvos macromoleculares. Como consequência disso, os métodos e ferramentas computacionais têm se tornando parte integral durante as etapas identificação e otimização de ligantes para o armazenamento, gerenciamento, análise de dados e modelagem molecular de compostos, tanto dentro das indústrias farmacêuticas quanto na academia. O desenvolvimento de estratégias e a aplicação de métodos computacionais para a solução dos problemas associados à seleção e otimização de candidatos a fármacos fazem parte do escopo de uma disciplina da Química Medicinal que se chama *Quiminformática*.

O termo “*quiminformática*” foi definido pela primeira vez por Brown (1998)¹⁰ como “*uma combinação de recursos para transformar dados em informação e informação em conhecimento, com o propósito de se tomar melhores decisões mais*”

rapidamente dentro do processo de planejamento de fármacos". Uma definição mais ampla foi dada por Gasteiger: "A *Quiminformática* consiste do uso dos métodos de informática para resolver problemas químicos".¹¹

Nos últimos anos, a Quiminformática tem emergido como um avanço tecnológico guiado pelas inovações na área de informática para alavancar as pesquisas pré-clínicas, uma vez que ela une todas as frentes de pesquisa, dos ensaios virtuais à toxicologia animal, por via de um único elemento central: a *estrutura química*. Os seguintes protocolos de química computacional fazem parte das atividades da Quiminformática no contexto da descoberta de fármacos: descrição, manipulação e análise de bancos de dados de estruturas químicas (virtuais ou reais); SAR (qualitativos ou quantitativos) para a identificação de séries de compostos-líderes; pós-processamento de dados obtidos em ensaios (reais ou virtuais) contra os alvos; planejamento *de novo* para geração e otimização de compostos-líderes; ensaios *in silico* para a predição de propriedades ADME, predição do metabolismo e toxicologia; mineração e visualização de dados; *ensaios virtuais*.¹²

De todos esses protocolos, os métodos mais amplamente utilizados para a identificação, seleção e otimização de ligantes a compostos-líderes são provavelmente os *ensaios virtuais*. Neste trabalho, foram empregados diferentes métodos de ensaios virtuais com este propósito, focando em dois alvos enzimáticos presentes no parasito *Trypanosoma cruzi*. O tópico subsequente aborda conceitos importantes relacionados aos fundamentos e aplicações desses métodos na priorização de compostos para ensaios biológicos. Uma descrição mais detalhada sobre cada um dos métodos utilizados será dada nos Capítulos 5 e 6.

1.4.1. Ensaios Virtuais

Os ensaios virtuais (VS, do inglês, *Virtual Screening*) consistem da aplicação de modelos computacionais para selecionar ou priorizar compostos para ensaios experimentais. Através de ensaios virtuais é possível pontuar, classificar ou filtrar moléculas contidas em grandes bancos de dados de acordo com as suas probabilidades de possuir alguma afinidade por um determinado alvo. Neste sentido, o ensaio virtual pode ser considerado como uma tentativa de estender o conceito por

detrás da QSAR, que originalmente focava em apenas pequenos conjuntos de compostos que consistiam de moléculas existentes e sinteticamente acessíveis.^{13,14}

O termo “*ensaio virtual*” foi proposto na década de 90, quando os métodos de descoberta de fármacos baseado em computadores alcançaram maturidade suficiente para oferecer uma alternativa às técnicas experimentais de HTS, que estavam tendo custos muito mais altos e desempenhos muito mais baixos que os previstos.¹⁵ Durante estes anos a indústria farmacêutica percebeu que métodos de ensaios virtuais poderiam ser um excelente complemento ao HTS¹⁶ e estes métodos se tornaram parte integral dentro do processo identificação de ligantes e otimização de compostos-líderes.^{6,17}

Em contraste com as técnicas de HTS, que são orientadas pela tecnologia utilizada, os ensaios virtuais são métodos orientados pelo conhecimento, ou seja, requerem alguma informação estrutural, seja ela a respeito das moléculas bioativas ou do próprio alvo de interesse.¹⁸ Assim, existem diferentes critérios pelos quais as estruturas dos compostos podem ser pontuados, ordenados ou filtrados através de um experimento de ensaio virtual. Por exemplo, um modelo matemático tal como de *regressão linear múltipla* pode ser construído para prever a atividade biológica de cada estrutura contida num banco de dados, ou então uma série de subestruturas moleculares de referência pode ser utilizada para eliminar moléculas que contêm funcionalidades indesejadas de uma coleção de compostos.¹⁹

O número de estruturas que podem ser consideradas no ensaio virtual é bastante grande. Por isso, muitas vezes é mais efetivo utilizar os métodos de ensaios virtuais sucessivamente e em ordem de complexidade crescente. Assim, cada método atua como um filtro para remover estruturas que não seriam interessantes posteriormente, até que ao final do processo uma série de estruturas candidatas componha um conjunto final para a seleção, síntese ou aquisição comercial.²⁰

O fluxograma mostrado na Figura 1.4 ilustra um esquema estratégico simples para o uso de diferentes métodos de ensaios virtuais na busca por moléculas bioativas. A adequação de cada um desses métodos depende da quantidade de dados estruturais e de bioatividade disponíveis. Quando somente uma única molécula bioativa é conhecida, então estudos de *busca por similaridade* podem ser efetuados. Se vários compostos ativos estão disponíveis é possível identificar um

conjunto de características estruturais comuns para estabelecer *hipóteses farmacofóricas* e utilizá-las para a busca em bancos de dados por compostos que satisfazem as condições estabelecidas pelas hipóteses geradas. Por outro lado, quando tanto um número razoável de compostos ativos e inativos é conhecido, eles podem ser usados para treinar um modelo de *aprendizado in silico* (do inglês, *Machine Learning*), tal como de redes neurais, para o ensaio virtual.^{21,22}

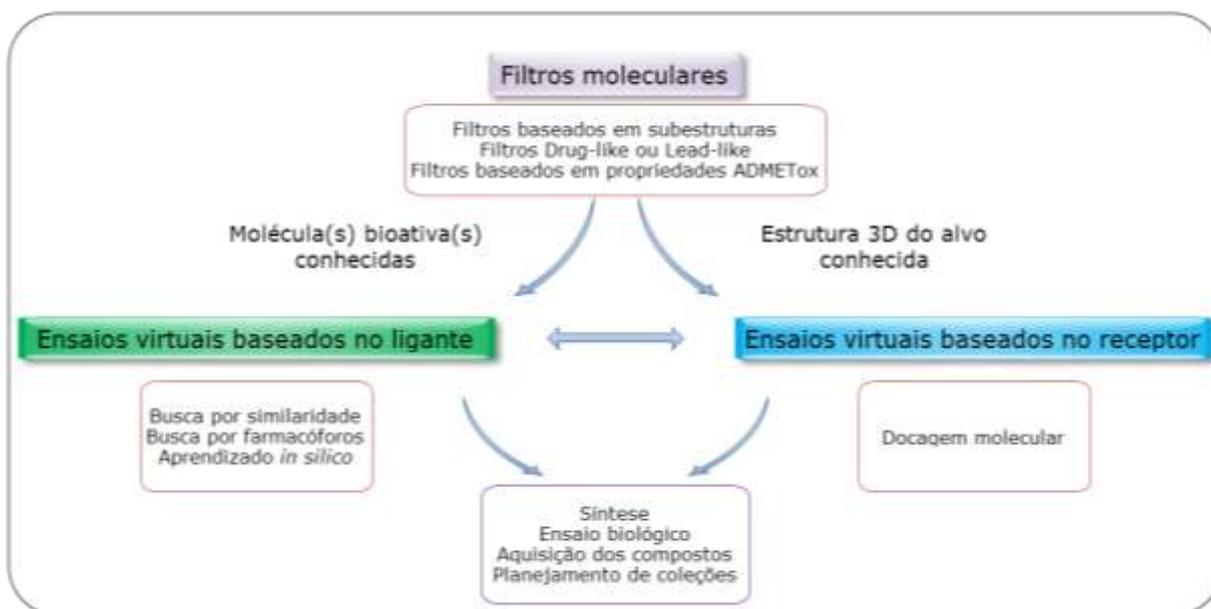


Figura 1.4 - Diagrama esquemático para a utilização dos diferentes métodos de ensaios virtuais

Além desses métodos, que são mais específicos para um determinado alvo, foram desenvolvidas outras técnicas de ensaios virtuais que possuem aplicabilidade mais geral. Por exemplo, os que tentam prever a probabilidade de uma molécula possuir características fármaco-similares (do inglês, *drug-like*) e as propriedades físico-químicas desejadas para que sejam capazes de alcançar o sítio de ação dentro do organismo.

Todas essas estratégias dependem do princípio da similaridade, a qual estabelece que moléculas similares devem exibir propriedades biológicas similares, e são chamadas de *ensaios virtuais baseados no ligante* (LBVS, do inglês, *Ligand-Based Virtual Screening*).

Quando a estrutura do alvo é conhecida, métodos computacionais baseados na estrutura do alvo podem ser empregados. Estes são chamados *ensaios virtuais baseados na estrutura do receptor* (SBVS, do inglês, *Structure-based Virtual Screening*). Entre estes, a *docagem molecular* (do inglês, *molecular docking*) é o

método mais amplamente utilizado. O objetivo desta abordagem é prever corretamente a estrutura do complexo intermolecular formado entre um ligante (uma pequena molécula ou até mesmo uma proteína) e um receptor (enzima, DNA, canais iônicos, receptores, etc.).²³

A predição correta da orientação e conformação de uma molécula ou fragmento em uma região de interesse (e.g. no sítio ativo) leva a dois desafios técnicos. O primeiro é a geração das poses, ou *docagem* (do inglês, *docking*), do ligante no sítio ativo. O segundo desafio é a avaliação das energias de interação das diferentes poses adotadas pelo ligante ao interagir com o alvo de uma maneira confiável para ordenar/ranquear os compostos de acordo com sua complementaridade estérica e eletrostática com o sítio de interação. Este processo é chamado de *pontuação*. Assim, o processo de docagem molecular pode ser dividido em duas partes: (i) docagem e (ii) pontuação.²⁴ Os programas de docagem usualmente fazem ambas as tarefas uma seguida da outra. Primeiro eles geram um grande número de poses, variando a orientação e a conformação dos ligantes através de um elemento chamado *algoritmo de busca* (do inglês, *search algorithm*) e então estimam os valores das energias de interação através de uma equação matemática que é composta por vários termos representativos dos fenômenos físico-químicos envolvidos na interação intermolecular, tais como interações de hidrogênio, interações iônicas, dessolvatação, efeitos entrópicos. Esta equação é chamada de *função de pontuação*.^{18,25}

1.4.1.1. *Docagem molecular*

As primeiras tentativas de docagem molecular foram feitas manualmente utilizando-se modelagem molecular interativa, e consistiam do posicionamento do ligante dentro sítio ativo, seguido da minimização para reduzir os contatos estéreos desfavoráveis. Esta abordagem pode ser bastante efetiva quando se tem uma boa noção do modo de interação esperado para o ligante. Entretanto, as estruturas de raios-X têm revelado que inibidores muito similares podem adotar modos de interações bastante distintos com o mesmo alvo.

O primeiro grande desafio da docagem é a *amostragem conformacional*. Existem seis graus de liberdade rotacionais e translacionais, mais os graus de liberdade conformacionais para cada molécula e, com o objetivo de varrer o espaço

configuracional gerado por estes graus de liberdade, vários *algoritmos de busca* têm sido descritos.^{26,27} As primeiras abordagens para solucionar este problema tratavam as estruturas do ligante e do receptor como *corpos rígidos* e amostravam somente os graus de liberdade rotacionais e translacionais. Atualmente, com o aumento da capacidade computacional, é possível levar em conta também os graus de liberdade conformacionais. As ferramentas de docagem mais comuns tratam o receptor como rígido e o ligante flexível e usam diferentes algoritmos de busca, que podem ser divididos em três categorias: sistemáticos, aleatórios/estocásticos e de simulação.

Os algoritmos de busca sistemática geram todas as conformações possíveis de uma molécula, porém podem demandar um custo computacional bastante elevado. Para amenizar este fato, alguns algoritmos possuem um sistema no qual o ligante pode ser construído incrementalmente dentro do sítio do alvo. Nos programas DOCK4.0,²⁸ e FlexX²⁹ por exemplo, o ligante é dividido em um núcleo rígido, chamado de *fragmento base*, e as partes flexíveis. O fragmento base é docado dentro do sítio e em seguida as partes flexíveis do ligante são adicionadas de maneira incremental. A vantagem desta técnica é que a busca conformacional pode ser restrita somente as conformações que se ajustam no sítio de interesse (preenchendo a região de acordo com a forma da cavidade), sendo assim bastante determinístico e preservando a vantagem em termos de rapidez sobre os métodos estocásticos.³⁰

Os métodos estocásticos aplicam mudanças aleatórias a um ligante ou população de ligantes. Os três métodos mais usados são Monte Carlo,³¹ *tabu search*, e algoritmo genético.³² Nesta abordagem as conformações dos ligantes são amostrados, docadas e pontuadas num primeiro passo, as melhores soluções são usadas como configurações de entrada (*seeds*) para a próxima sequência de docagem e pontuação e assim sucessivamente até que o número de passos estabelecido seja alcançado. Estes métodos apresentam bom desempenho em termos de velocidade e enriquecimento.

Os métodos de busca baseados em simulação utilizam programas de dinâmica molecular como AMBER,³³ CHARMM³⁴ e GROMOS³⁵. A vantagem da simulação é que tanto o alvo quanto o ligante são tratados como flexíveis. Entretanto, simulações de dinâmica molecular são incapazes de ultrapassar barreiras de energias conformacionais muito altas, o que pode fazer com que a

amostragem conformacional se limite a estruturas com energias em torno de um poço energético, tornando-a ineficiente. Além disso, este método é computacionalmente dispendioso e por isso limita-se a pequenos conjuntos de ligantes.

Novos métodos de docagem que utilizam combinações de protocolos têm sido desenvolvidos durante os últimos anos. O programa Glide³¹, desenvolvido pela empresa Schrödinger, é um dos métodos mais populares. Primeiramente, as propriedades do sítio ativo são mapeadas e representadas através de uma grade de potencial. Então, um conjunto de conformações de baixa energia do ligante gerado utilizando-se o método Monte Carlo é docado dentro do sítio de interação. As poses obtidas são minimizadas dentro do sítio de interação e as seis de mais baixa energia são selecionadas para uma simulação usando o método Monte Carlo.

Todos esses algoritmos se mostram efetivos na predição das poses de interação de ligantes conhecidos. Entretanto, ainda existem alguns outros desafios, como por exemplo o tratamento da flexibilidade do alvo, que precisam ser melhorados.

Cada pose receptor-ligante predita pelo algoritmo de busca é avaliada de acordo com a energia de interação entre as duas moléculas através da *função de pontuação*. Existem vários requerimentos que uma boa função de pontuação deve satisfazer. Primeiramente, em um SBVS, esta deve ser capaz de discriminar entre modos de interação corretos e incorretos de ligantes conhecidos com boa acurácia e rapidez. Em segundo lugar, deve ser capaz de distinguir entre prováveis ligantes e moléculas inativas. A função de pontuação ideal deveria ser capaz de calcular a Energia Livre de interação (G_{int}) com exatidão. O problema é que nenhuma função de pontuação é capaz de fazer isto porque são todas baseadas em várias suposições e simplificações. Além disso, também não levam em consideração os efeitos entrópicos envolvidos por completo. Assim, não é o ΔG_{int} que é estimado pela função, mas sim a complementaridade receptor-ligante, a qual certamente é um requisito para a interação e pode ser correlacionada com a energia associada. Atualmente, existem três tipos ou classes disponíveis de funções de pontuação: (i) baseadas em campo de força; (ii) empíricas e (iii) baseadas no conhecimento.²⁴

(i) As funções de pontuação baseadas em campo de força^{36,37,38} aproximam a energia associada à formação do complexo como uma soma de dois termos de

campo de força (e.g. AMBER, CHARMM), um relacionado às interações de van der Waals e outro às eletrostáticas. Em geral, devido ao fato de serem formuladas para modelar contribuições entálpicas das interações receptor-ligante em estado gasoso, não incluem termos de solvatação e entrópicos, o que leva a uma descrição menos acurada das interações eletrostáticas bem como a uma dependência dos valores de energia com o tamanho dos compostos. Melhores estimativas da energia de interação são obtidos quando termos adicionais de energia de dessolvatação são calculados.³⁹

(ii) Em funções de pontuação empíricas a afinidade entre o ligante e o receptor é decomposta em uma série de termos que representam as interações de hidrogênio, contatos estéricos, interações iônicas, interações hidrofóbicas, efeitos de solvatação e entrópicos, e cada um deles é multiplicado por um peso determinado através do ajuste matemático aos dados experimentais (ΔG_{int}). Os termos são simples de se obter, mas não é claro se este tipo de função é capaz de prever a afinidade de ligantes estruturalmente distintos dos contidos no conjunto de treinamento;

(iii) Nas funções de pontuação baseadas no conhecimento são construídos vários potenciais para caracterizar os diferentes tipos de interações entre fragmentos dos ligantes e dos receptores observadas em várias estruturas cristalográficas de complexos receptor-ligante. Então, o ΔG_{int} é aproximado pela soma de todos esses os potenciais. Além da simplicidade computacional, o que permite avaliar extensas coleções virtuais de compostos, este tipo de função pode ser aplicada a diferentes sistemas, mesmo que eles não tenham sido usados para construí-la. Uma desvantagem deste tipo de função é que a parametrização é essencialmente baseada em informação implícita codificada a partir de um número limitado de estruturas de complexos receptor-ligante. Por outro lado, elas são capazes de modelar interações não tão comuns como *enxofre- π* ou *cátion- π* .

Existem muitos programas de docagem molecular e várias modificações dessas três classes de função de pontuação e quase sempre há dúvida sobre qual combinação é mais apropriada para cada tipo de sistema. Apesar da grande quantidade de trabalhos na literatura avaliando e comparando diversos programas de docagem e funções de pontuação para descobrir quais combinações são capazes de reproduzir poses cristalográficas, prever corretamente a afinidade e discriminar entre compostos ativos e inativos, as conclusões vão sempre na mesma

direção: alguns são melhores que outros apenas para determinadas classes de receptores.

1.4.1.2. Aspectos Práticos da docagem molecular

Preparação do banco de dados de compostos

O primeiro passo da docagem molecular é preparar as estruturas do ligante e do receptor. Para se buscar por ligantes, é necessário docar muitos compostos, normalmente disponíveis em *coleções virtuais* corporativas ou de catálogos de empresas que comercializam compostos para ensaios.²⁴ Vários bancos de dados contendo estruturas de pequenas moléculas interessantes do ponto de vista biológico e suas propriedades físico-químicas têm sido compilados.⁴⁰ Estes, incluem compostos químicos conhecidos, fármacos, carboidratos, reagentes, produtos naturais e derivados.^{41,42} Alguns exemplos são: PubChem⁴³, que fornece informações sobre a atividade biológica de mais de 40 milhões de pequenas moléculas e 19 milhões de estruturas únicas; ACD®,⁴⁴ da empresa MDL (*Molecular Design Limited*) que contém mais de 571 mil compostos comercialmente disponíveis e outras 4,5 milhões de estruturas; ZINC,⁴⁵ um banco de dados de domínio público com mais de 20 milhões de estruturas químicas e propriedades biologicamente relevantes (e.g. MW, *log P* calculado, número de ligações livres); Drugbank,⁴⁶ que armazena informações detalhadas sobre aproximadamente 4800 fármacos, incluindo mais de 3243 compostos em Fase Clínica; Emolecules,⁴⁷ que contém mais de 8 milhões de compostos comercialmente disponíveis. WOMBAT,⁴⁸ entre outros.⁴⁹

É recomendado que os membros de uma coleção virtual utilizados num estudo de docagem molecular sejam pré-filtrados. Os filtros mais comumente usados são o número de ligações livres, área superficial polar⁵⁰ e a *regra dos cinco* de Lipinski,⁵¹ que prevê o perfil necessário para compostos com boa disponibilidade oral. Também é possível remover compostos contendo subestruturas conhecidas por suas baixas estabilidades químicas ou toxidez.

Na maioria das vezes os compostos contidos em bancos de dados estão representados em algum formato 2D, então é necessário gerar suas representações 3D. Um cuidado especial deve ser tomado nesse estágio para a atribuição acurada de estados tautoméricos e de protonação fisicamente relevantes para as estruturas.

Frequentemente, os compostos são armazenados em bancos de dados como tautômeros que não representam os estados mais prováveis das moléculas e é difícil atribuir o estado correto. Assim, todos os estados relevantes devem ser gerados. Similarmente, como a estereoquímica dos centros quirais é geralmente incerta, todos os estereoisômeros devem ser gerados. Vários métodos estão disponíveis para a geração das estruturas 3D moléculas (e.g. Corina,⁵² Confort⁵³ e Omega⁵⁴). Adicionalmente, existem ferramentas para preparar estruturas para docagem (e.g. Ligprep⁵⁵) e bancos de dados de domínio públicos nos quais os compostos já estão disponíveis preparados para o uso em docagem molecular ou outro tipo de ensaio virtual (e.g. ZINC⁴⁵). O impacto do pré-processamento em SBVS foi estudado por Knox *et al.* (2005) em um trabalho no qual eles utilizaram um banco de dados contendo compostos conhecidamente ativos e inativos para os quais foram atribuídos múltiplos estados de protonação, formas tautoméricas, estereoquímica e amostragem conformacional.⁵⁶ Os autores mostraram que estes fatores tem um grande efeito sobre a taxa de acerto deste tipo de ensaio virtual e concluem que o enriquecimento da coleção virtual é altamente dependente dos tratamentos iniciais utilizados na sua construção. O enriquecimento é um parâmetro estatístico utilizado para avaliar a eficiência dos métodos de ensaios virtuais na recuperação dos compostos verdadeiramente ativos em meio a compostos inativos (iscas, do inglês, *decoys*).

Preparação do alvo

Atualmente, graças à genômica estrutural e a cristalografia de raios-X, as estruturas 3D de vários alvos de interesse terapêutico são conhecidas. Quando nenhuma informação sobre o alvo é conhecida, ainda assim é possível construir um modelo com base na estrutura de outra proteína que possui sequência de aminoácidos similar, através de técnicas de modelagem por homologia,⁵⁷ com os quais também tem se obtido sucesso em estudos de docagem molecular.⁵⁸

Se várias estruturas do alvo estão disponíveis, tais como formas apo (sem ligantes complexados), holo (complexadas com ligantes e/ou substratos) ou modelo de homologia, deve-se escolher qual estrutura se mostra mais adequada para o estudo. Este problema foi examinado por McGovern⁵⁹ e colaboradores em um

estudo no qual eles docaram uma grande quantidade pequenas moléculas contra 10 alvos utilizando as formas apo, holo e modelada do sítio ativo. De acordo com a taxa de enriquecimento da coleção virtual para cada uma das estruturas, eles encontraram que a prioridade deve ser dada à forma holo, depois apo e por última a estrutura modelada. Este fato também foi confirmado por Erickson *et al.* que mostraram um decréscimo dramático na acurácia da docagem com a utilização de uma estrutura apo média.⁶⁰ Entretanto, deve-se ter em vista que a forma holo pode ter sofrido grandes modificações conformacionais devido ao ajuste induzido pelo ligante. Se este for o caso, então é provável que se obtenha uma baixa taxa de recuperação para ligantes similares, porém um pouco maiores, devido a restrições estéreas.⁶¹ Em geral, observa-se que o SBVS alcança resultados melhores que uma escolha aleatória independente da estrutura utilizada, mas a utilização da forma holo produz um enriquecimento maior se forem tomados os cuidados apropriados.

Assim como a preparação da coleção virtual de compostos, a preparação do alvo também requer bastante cuidado. Estados de protonação ou formas tautoméricas incorretas podem levar a sérios erros na docagem. Polgar *et al.*⁶² mostraram a importância dos estados de protonação em experimentos de docagem molecular para identificação de inibidores da enzima β -secretase. Eles observaram um aumento na taxa de enriquecimento após a mudança dos estados de protonação dos resíduos catalíticos Asp32 e Asp228. Alguns métodos de docagem requerem a adição dos átomos de hidrogênios à proteína, neste caso é recomendado que após adicionados, suas posições sejam relaxadas através de minimização de energia para evitar contatos estéricos desfavoráveis. Os posicionamentos dos átomos de hidrogênios em grupos hidroxilas (como de Treoninas ou Serinas, por exemplo) também devem ser cuidadosamente checados e alterados, se necessário, para favorecer ou não um dos tipos de interação com possíveis ligantes. Em geral, esta decisão não é tão simples e depende da informação disponível a respeito do processo de reconhecimento molecular de ligantes conhecidos. Em alguns casos, interações de hidrogênio mediadas por moléculas de águas cristalográficas devem ser mantidas por participarem efetivamente no processo de formação dos complexos do receptor com diferentes ligantes.

A flexibilidade do alvo

A flexibilidade do alvo tem sido um problema na pesquisa e desenvolvimento de métodos de docagem molecular. É bem conhecido que ocorrem mudanças conformacionais nos sítios de interação com a aproximação do ligante para maximizar a complementaridade entre o ligante e o receptor. Deste modo, a consideração da estrutura do alvo como rígida no processo de docagem molecular constitui um problema que sempre irá levar à predição incorreta de modos de interação, afinidades e a perda de potenciais ligantes. A docagem ideal seria feita permitindo-se a flexibilidade do ligante e pelo menos parte da estrutura do receptor. Isto levaria a uma descrição mais realista do sistema sendo simulado e poderia aumentar a diversidade estrutural dos novos ligantes descobertos. Poucos programas de docagem levam em conta a flexibilidade do receptor: Autodock³², FlexE⁶³ e QXP⁶⁴. Entretanto, o aumento do número de graus de liberdade também aumenta a complexidade e o custo computacional. Diferentes métodos têm sido descritos na literatura para tratar desse problema, normalmente focando exclusivamente na flexibilidade do sítio de interação através do uso de amostragem conformacional usando Dinâmica Molecular, Monte Carlo ou biblioteca de rotâmeros. Entretanto, a flexibilidade da proteína também pode ser tratada utilizando-se conjuntos de conformações da mesma proteína ao invés de uma única estrutura ou permitindo-se algum contato estérico desfavorável pelo ajuste do termo de repulsão na função de pontuação. Em alguns casos estes métodos podem ajudar na predição do modo correto de interação do ligante, entretanto não fornece uma visão adequada das interações receptor-ligante, já que as conformações dos resíduos chaves do sítio de interação podem ser inconsistentes com a pose correta do ligante no sítio. No caso do método de amostragem conformacional, o relaxamento do sítio devido a ausência do inibidor pode provocar um aumento do tamanho da cavidade de interação, levando a seleção de falso-positivos no experimento de ensaio virtual.

É claro que para resolver o problema da predição da estrutura do complexo é necessário permitir que ambas as estruturas do ligante e do receptor se reorganizem durante a docagem. Recentemente, Shermam *et al.* (2006) propuseram um protocolo, o qual chamaram de IFD (do inglês, *Induced Fit Docking*⁶⁵), que combina de um modo interativo a docagem de ligantes em um receptor rígido efetuada pelo

programa Glide³¹ com a modelagem das mudanças conformacionais do receptor implementado no programa Prime.^{66,67} A estratégia consiste em primeiramente docar os ligantes dentro do sítio do receptor rígido utilizando-se uma função de pontuação menos restritiva aos contatos estéreos para não evitar que pelo menos uma pose do ligante assumindo uma conformação próxima da correta seja predita. Então é feita uma amostragem dos graus de liberdade dos resíduos do receptor (i.e. rotâmeros das cadeias laterais), seguida da minimização do complexo das várias poses para identificar conformações do complexo receptor-ligante de baixa energia livre. Em seguida é feita uma segunda etapa de docagem na estrutura do receptor refinada, desta vez com termos de contatos estéreos mais restritivos. Finalmente, uma função de pontuação composta é aplicada para ordenar os complexos em termos das energias de interação e também de solvatação.

Este protocolo foi aplicado com sucesso na realização deste trabalho e uma descrição mais detalhada do método dentro do contexto no qual ele está inserido será dada na seção 6.2.6.

1.5. Conclusões

O papel da Química Medicinal como pivô central da integração de diversas áreas do conhecimento e tecnologias para a descoberta e desenvolvimento de fármacos é fundamental. Somente através deste entrelace é possível estudar, compreender e intervir de modo racional nas diferentes fases de ação de pequenas moléculas dentro do organismo através da modulação de suas propriedades biológicas como resultado da manipulação das estruturas químicas.

Os avanços nos métodos experimentais e também da capacidade computacional vem cada vez mais possibilitando a elaboração de modelos *in silico* robustos para o enriquecimento de coleções de compostos, bem como para a seleção e otimização de ligantes a compostos-líderes através dos métodos em Quiminformática. Estes métodos, principalmente os ensaios virtuais, que constituem as principais ferramentas empregadas na realização deste trabalho, geralmente permitem um enriquecimento significativo em relação à seleção aleatória de compostos em bancos de dados, pois, após suas aplicações, os compostos mais bem pontuados da lista podem ser priorizados para os ensaios experimentais.

Para o caso no qual tanto a estrutura do alvo quanto de um ou mais ligantes são conhecidas, pode-se usar LBVS e SBVS de modo complementar e sinérgico. Deste modo, todas as moléculas contidas em um banco de dados podem ser pontuadas, em relação à similaridade com os ligantes ou ainda de acordo com suas complementaridades com o sítio de interação do alvo macromolecular, para refletir a ordem decrescente de probabilidade de serem ativas; permitindo assim, a priorização de compostos para os ensaios experimentais. Esta estratégia representa abordagem com ótimo custo-benefício dentro dos programas de descoberta de fármacos.

1.6. Referência

1. WERMUTH, C. G. Medicinal chemistry: definition and objectives, the three main phases of drug activity, drug and disease classifications. In: WERMUTH, C. G. (Ed.). **The practice of medicinal chemistry**. Amsterdam: Academic Press, 2003. p. 29-40.
2. WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERB, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure Applied Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 1129-1143, 1998.
3. LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery [mdash] then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
4. TAMIMI, N. A. M.; ELLIS, P. Drug development: from the concept to marketing! **Nephron Clinical Practice**, v. 113, n. 3, p. c125-c131, 2009.
5. WESS, G.; URMANN, M.; SICKENBERGER, B. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, p. 341-3350, 2001.
6. BLEICHER, K. H.; BÖHM, H.-J.; MULLER, K.; ALANINE, A. L. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 369-378, 2003.
7. KESERU, G. M.; MAKARA, G. M. Hit discovery and hit-to-lead approaches. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 15/16, p. 742-748, 2006.
8. LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855-860, 2004.
9. VAN DEURSEN, R.; REYMOND, J.-L. Chemical space travel. **ChemMedChem**, v. 2, n. 5, p. 636-640, 2007.
10. BROWN, F.K. Chemoinformatics: What is it and How does it Impact Drug Discovery. In: BRISTOL, J. A. (Ed.). **Annual Reports in Medicinal Chemistry**. Ann Arbor: Academic Press, 1998. v. 33, p. 375-384.
11. GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, n. 1-2, p. 200-209, 2006.
12. OPREA, T. I. Chemoinformatics and the quest for leads in drug discovery. In: GASTEIGER, J. (Ed.). **Handbook of chemoinformatics**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. p. 1509-1531.

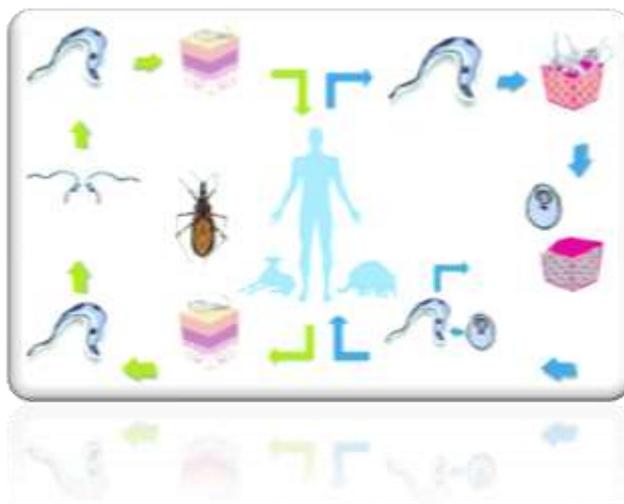
13. OPREA, T. I.; MATTER, H. Integrating virtual screening in lead discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 4, p. 349-358, 2004.
14. LEACH, A. R.; GILLET, V. J. Virtual screening. In: LEACH, A. R.; GILLET, V. (Eds.). **An introduction to chemoinformatics**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 159-182.
15. LAHANA, R. How many leads from HTS? **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 10, p. 447-448, 1999.
16. STAHURA, F. L.; BAJORATH, J. Virtual screening methods that complement HTS. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening**, v. 7, n. 4. p. 259-269, 2004.
17. BAJORATH, J. Integration of virtual and high-throughput screening. **Nature Reviews in Drug Discovery**, v. 1, n. 11, p. 882-894, 2002.
18. ETKINS, E.; MESTRES, J.; TESTA, B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual screening and profiling. **British Journal of Pharmacology**, v. 152. n. 1, p. 9-20, 2007.
19. MCGOVERN, S. L.; CASELLI, E.; GRIGORIEFF, N.; SHOICHET, B. K. A Common Mechanism Underlying Promiscuous Inhibitors from Virtual and High-Throughput Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 1712-1722, 2002.
20. CHARIFSON, P. S.; WALTERS W. P. Filtering Databases and Chemical Libraries. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 5-6, p. 311-323, 2002.
21. DOUGUET, D. Ligand-based approaches in virtual screening. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 4, n. 3, p. 180-190, 2008.
22. SONG, M. S.; LIM, S. J.; TONG J. C. Recent advances in computer-aided drug design. **Briefings in Bioinformatics**, v. 10, n. 5, p. 579-591, 2009.
23. BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Reviews of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 335-373, 2003.
24. COUPEZ, B.; LEWIS, R. A. Docking and scoring – theoretically easy, practically impossible? **Current Medicinal Chemistry**. v.13, n. 25, p. 2995-3003, 2006.
25. KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
26. TAYLOR, R. D.; JEWSEBURY, P.J.; ESSEX, J.W. A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151-166, 2002.
27. HALPERIN, I.; MA, B.Y.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Principles of docking: an overview of search algorithms and a guide to scoring functions. **Proteins: Structure, Function, and Genetics**, v. 47, n. 4, p. 409-443, 2002.
28. EWING, T. J.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A.G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: Search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 15, n. 5, p. 411-421, 2001.
29. RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **Journal of Molecular Biology**, v. 261, n. 3, p. 470-489, 1996.
30. GASTREISH, M.; LEMMEN, C.; BRIEM, H.; RAREY, M. Addressing the virtual screening challenge: the Flex* approach. In: ALVARES, J.; SHOICHET, B. (Eds.). **Virtual screening in drug discovery**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 25-43.

31. FRIESNER, R. A.; BANKS, J. L.; MURPHY, R. B.; HALGREN, T. A.; KLICIC, J. J.; MAINZ, D. T.; REPASKY, M. P.; KNOLL, E. H.; SHELLEY, M.; PERRY, J. K.; SHAW, D. E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P. S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 7, p. 1739-1749, 2004.
32. MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.
33. CASE, D. A.; CHEATHAM III, T. E.; DARDEN, T.; GOHLKE, H.; LUO, R.; JR., K. M. M.; ONUFRIEV, A.; SIMMERLING, C.; WANG, B.; WOODS, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry*, v. 26, n. 16, p. 1668-1688, 2005.
34. BROOKS, B. R.; III, C. L. B.; JR., A. D. M.; NILSSON, L.; PETRELLA, R. J.; ROUX, B.; WON, Y.; ARCHONTIS, G.; BARTELS, C.; BORESCH, S.; CAFLISCH, A.; CAVES, L.; CUI, Q.; DINNER, A. R.; FEIG, M.; FISCHER, S.; GAO, J.; HODOSCEK, M.; IM, W.; KUCZERA, K.; LAZARIDIS, T.; MA, J.; OVCHINNIKOV, V.; PACI, E.; PASTOR, R. W.; POST, C. B.; PU, J. Z.; SCHAEFER, M.; TIDOR, B.; VENABLE, R. M.; WOODCOCK, H. L.; WU, X.; YANG, W.; YORK, D. M.; KARPLUS, M. CHARMM: The biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 10, p. 1545-1614, 2009.
35. CHRISTEN, M.; HÜNENBERGER, P. H.; BAKOWIES, D.; BARON, R.; BÜRGI, R.; GEERKE, D. P.; HEINZ, T. N.; KASTENHOLZ, M. A.; KRÄUTLER, V.; OOSTENBRINK, C.; PETER, C.; TRZESNIAK, D.; GUNSTEREN, W. F. V. The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05. *Journal of Computational Chemistry*, v. 26, n. 16, p. 1719-1751, 2005.
36. KOLLMAN, P. Free energy calculations: Applications to chemical and biochemical phenomena. *Chemical Reviews*. v. 93, n. 7, p. 2395-2417, 1993.
37. HALPERIN, I.; MA, B.; WOLFSON, H.; NUSSINOV, R. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, v. 47, n. 4, p. 409-443, 2002.
38. CARLSON, H. A.; JORGENSEN, W. L. An Extended Linear Response Method for Determining Free Energies of Hydration. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 99, n. 26, p. 10667-10673, 2002.
39. STAHL, M. Structure-based library design. In: BOHM, H. J.; SCHNEIDER, G. (Eds.). *Virtual screening for bioactive molecules*. Weinheim: Wiley-VCH, 2000. p. 229-259.
40. CHEN, J.; SWAMIDASS, S. J.; DOU, Y.; BRUAND, J.; BALDI, P. ChemDB: a public database of small molecules and related cheminformatics resources. *Bioinformatics*, v. 21, n. 22, p. 4133-4139, 2005.
41. GOTO, S.; OKUNO, Y.; HATTORI, M.; NISHIOKA, T.; KANEHISA, M. LIGAND: database of chemical compounds and reactions in biological pathways. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 1, p. 402-404, 2002.
42. ORTHOLAND, J.-Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 8, n. 3, p. 271-280, 2004.
43. WANG, Y.; XIAO, J.; SUZEK, T. O.; ZHANG, J.; WANG, J.; BRYANT, S. H. PubChem: a public information system for analyzing bioactivities of small molecules. *Nucleic Acids Research*, v. 37, n. suppl_2, p. W623-633, 2009.
44. AVAILABLE Chemicals Directory (ACD). Disponível em: <<http://www.symyx.com>>. Acesso em: 14 jan. 2010.

45. IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2004.
46. WISHART, D. S.; KNOX, C.; GUO, A. C.; SHRIVASTAVA, S.; HASSANALI, M.; STOTHARD, P.; CHANG, Z.; WOOLSEY, J. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Research*, v. 34, n. suppl_1, p. D668-672, 2006.
47. EMOLECULES – Chemical structure drawing search. Disponível em: <<http://www.emolecules.com>>. Acesso em 14 jan. 2010.
48. WORLD MOLECULAR BIOACTIVITY (WOMBAT). Disponível em : <<http://www.sunsetmolecular.com>>. Acesso em 14 jan. 2010.
49. JONSDOTTIR, S. O.; JORGENSEN, F. S.; BRUNAK, S. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics*, v. 21, n. 10, p. 2145-2160, 2005.
50. PALM, K.; LUTHMAN, K.; UNGELL, A.-L.; STRANDLUND, G.; ARTURSSON, P. Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 1, p. 32-39, 1996.
51. LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.
52. SADOWSKI, J.; GASTEIGER, J.; KLEBE, G. Comparison of Automatic Three-Dimensional Model Builders Using 639 X-ray Structures. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 34, n. 4, p. 1000-1008, 2002.
53. GOTO, H.; OSAWA, E. An efficient algorithm for searching low-energy conformers of cyclic and acyclic molecules. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. v. 2, n. 2, p. 187-198, 1993.
54. OMEGA, version 2.0.1. Santa Fe: OpenEye Scientific Software, 2008. 1 CD-ROM
55. LIGPREP, version 2.0. New York: Schrödinger LCC, 2005. 1 CD-ROM
56. KNOX, A. J. S.; MEEGAN, M. J.; CARTA, G.; LLOYD, D. G. Considerations in compound database preparation “Hidden” Impact on Virtual Screening Results. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 45, n. 6, p. 1908-1919, 2005.
57. HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. *Drug Discovery Today*, v. 9, n. 15, p. 659-669, 2004.
58. KIYAMA, R.; TAMURA, Y.; WATANABE, F.; TSUZUKI, H.; OHTANI, M.; YODO, M. Homology Modeling of Gelatinase Catalytic Domains and Docking Simulations of Novel Sulfonamide Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 10, p. 1723-1738, 1999.
59. MCGOVERN, S. L.; SHOICHET, B. K. Information decay in molecular docking screens against holo, apo, and modeled conformations of enzymes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 14, p. 2895-2907, 2003
60. ERICKSON, J. A.; JALAIE, M.; ROBERTSON, D. H.; LEWIS, R. A.; VIETH, M. Lessons in molecular recognition: the effects of ligand and protein flexibility on molecular docking accuracy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 1, p. 45-55, 2003.

61. BISSANTZ, C.; BERNARD, P.; HIBERT, M.; ROGNAN, D. Protein-based virtual screening of chemical databases. II. Are homology models of g-protein coupled receptors suitable targets? ***Proteins: Structure, Function, and Genetics***, v. 50, n. 1, p. 5-25, 2003.
62. POLGAR, T.; KESERU, G. M. Virtual screening for β -secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at asp32 and asp228. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 48, n. 11, p. 3749-3755, 2005.
63. CLAUBEN, H.; BUNING, C.; RAREY, M.; LENGAUER, T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. ***Journal of Molecular Biology***, v. 308, n. 2, p. 377-395, 2001.
64. MCMARTIN, C.; BOHACEK, R. S. QXP: Powerful, rapid computer algorithms for structure-based drug design. ***Journal of Computer-Aided Molecular Design***, v. 11, n. 4, p. 333-344, 1997.
65. SHERMAN, W.; DAY, T.; JACOBSON, M. P.; FRIESNER, R. A.; FARID, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. ***Journal of Medicinal Chemistry***, v. 49, n. 2, p. 534-553, 2005.
66. ANDREC, M.; HARANO, Y.; JACOBSON, M. P.; FRIESNER, R. A.; LEVY, R. M. Complete protein structure determination using backbone residual dipolar couplings and sidechain rotamer prediction. ***Journal of Structural and Functional Genomics***, v. 2, n. 2, p. 103-111, 2002.
67. PRIME, version 1.5. New York: Schrödinger LCC, 2005. 1 CD-ROM

Capítulo 2



A Doença de Chagas

Neste capítulo é apresentada uma breve descrição da Doença de Chagas e o seu o panorama atual, seguida de suas manifestações clínicas e a quimioterapia disponível. Por último são revisadas algumas das vias atualmente estudadas na busca por novos agentes tripanocidas e introdução dos alvos enzimáticos utilizados neste trabalho.

2.1. Descrição e panorama atual da doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, foi descoberta e etiologicamente descrita por Carlos Chagas em 1909.^{1,2} Esta enfermidade é causada pela infecção com o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, pertencente à família dos tripanossomatídeos, da qual existem muitos parasitos que infectam principalmente mamíferos. Os protozoários desta família causam um vasto número de doenças parasitárias que estão entre as mais negligenciadas do mundo pela indústria farmacêutica, como as Leishmanioses causadas por diferentes gêneros da espécie *Leishmania*,³ e a Doença do sono, cujo agente etiológico é o *Trypanosoma brucei*.^{4,5} Entretanto, ao contrário desses dois males, a Doença de Chagas é endêmica somente em países latino-americanos (Figura 2.1)⁶. Muito embora, devido à crescente imigração de pessoas infectadas para áreas não endêmicas, já são encontrados casos em países como os Estados Unidos, Canadá, Espanha e Austrália.

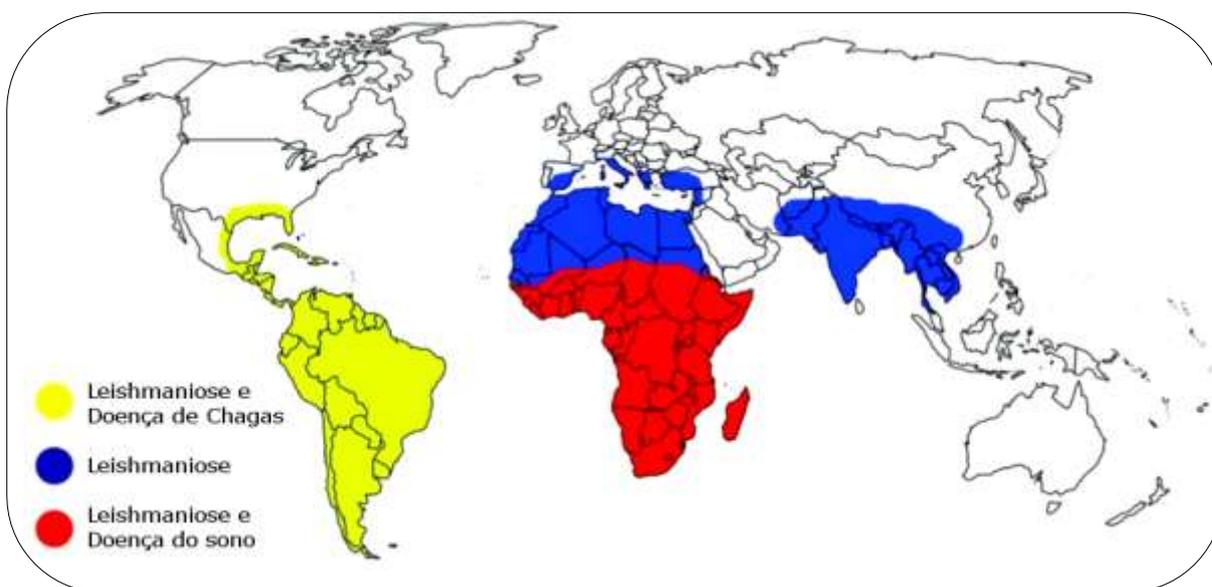


Figura 2.1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas, doença do sono e da leishmaniose⁶

Segundo dados da OMS mais de 25 milhões de pessoas se encontram em áreas de risco, enquanto 8-9 milhões de pessoas (incluindo aproximadamente 100.000 nos Estados Unidos) estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. Para completar o quadro, estima-se que a cada ano 14.000 pessoas morram devido às complicações causadas pela doença e cerca de 200.000 sejam infectadas.⁷⁻⁹

2.2. Ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*

A Figura 2.2 mostra uma ilustração dos ciclos de vida do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor e em mamíferos. O ciclo de vida do parasito no inseto vetor inicia quando a forma *tripomastigota* é ingerida pelo mosquito *triatomíneo* conhecido vulgarmente como “barbeiro”. Em seguida as *tripomastigotas* diferenciam-se para a forma *epimastigota*, que é a forma replicativa do parasito no intestino do inseto. Após a replicação, as *amastigotas* transformam-se novamente em *tripomastigotas* e é nesse estágio que ocorre a contaminação do homem ou de outros mamíferos.¹⁰

Em cerca de 90% dos casos a infecção de humanos ocorre através do inseto vetor. Ao picar a vítima para sugar o sangue, o inseto defeca sobre a pele e, no ato involuntário de coçar o ferimento, os parasitos contidos nas fezes são transferidos para a corrente sanguínea da vítima. A contaminação através de transfusão sanguínea ou via congênita também podem ocorrer. Casos de infecção através da ingestão de alimentos contaminados pelo parasito têm sido identificados e o mecanismo pelo qual este processo ocorre já foi elucidado.^{10 -13}

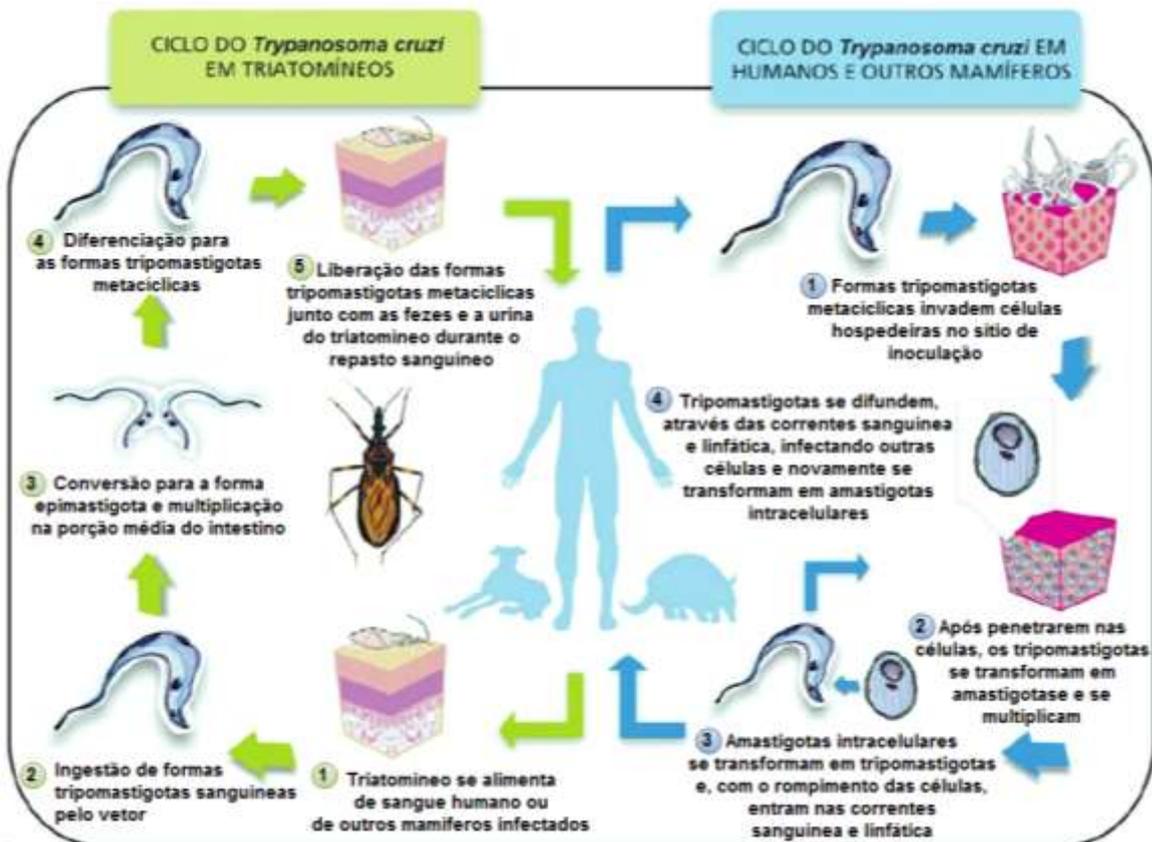


Figura 2.2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor e em humanos e outros mamíferos¹¹

Uma vez dentro da célula do hospedeiro as *tripomastigotas* transformam-se na forma replicativa em humanos, a *amastigota*, que se reproduzem várias vezes antes de voltar à forma *tripomastigota* e ser liberada para as correntes sanguínea e linfática após o rompimento da parede celular. Uma vez que isto ocorre, o parasito se espalha pelo organismo invadindo novas células e repetindo o processo de replicação (Figura 2.2).^{11,13}

Enquanto se espalha pelo corpo carregado pelo sangue o parasito também fica disponível para transferência ao inseto vetor através da picada e assim seguir novamente seu ciclo no triatomíneo.

2.3. Manifestações clínicas

A doença de Chagas apresenta uma fase *aguda* e outra *crônica*. A primeira geralmente é assintomática, embora raramente possa levar ao desenvolvimento da meningoencefalite, que é fatal. Outros sintomas possíveis são: febre, anorexia, dilatação do fígado e do baço, e inflamações do miocárdio. O caso crônico permanece assintomático entre dez e vinte anos. No entanto, neste período de bem-estar geral, o parasito continua se reproduzindo continuamente em baixos números, causando danos irreversíveis em órgãos como o cérebro e o coração. O resultado é apenas aparente após uma ou duas décadas de progressão, com o aparecimento gradual de demência (3% dos casos iniciais), insuficiência cardíaca (em 30% dos casos), dilatação do trato digestivo (megaesôfago ou megacólon, em 6% dos casos), devido à destruição da inervação e das células musculares destes órgãos, as quais são responsáveis pelo tônus muscular. No cérebro há frequentemente a formação de granulomas. Neste estágio a doença é geralmente fatal mesmo com tratamento.^{13,14}

2.4. Tratamento

As doenças tropicais afligem milhões de pessoas, resultam em elevadas taxas de mortalidade e consequências sociais e econômicas devastadoras. Apesar disso, elas são largamente negligenciadas pela indústria farmacêutica por afetarem principalmente pessoas pobres nos países tropicais e, desse modo, não são vistas

como um mercado atraente para impulsionar investimentos no desenvolvimento de novos fármacos.¹⁵ Por tudo isso, doenças como a malária, leishmaniose, doença do sono, elefantíase e a doença de Chagas são geralmente denominadas como *doenças tropicais negligenciadas*. Esse termo é bem apropriado, já que dos mais de 1300 fármacos introduzidos para todas as indicações terapêuticas entre 1975 e 1999, somente 13 tinham como alvo as doenças tropicais. Em 2000, somente 0,1% do investimento global em pesquisas na área de saúde foram destinados para a busca de fármacos contra a malária, leishmaniose, tripanossomíases e tuberculose.¹⁶

Os únicos fármacos atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, o Nifurtimox (Lampit[®], Bayer) e Benzonidazol (Rochagan[®], Radanil[®], Roche), cujas estruturas são mostradas na Figura 2.3, foram introduzidos há mais de 30 anos. Estes fármacos são ativos nas fases aguda e crônica da doença, entretanto, nenhum deles respeita os critérios estabelecidos pela OMS para serem considerados bons fármacos, ou seja: (i) cura parasitológica nas fases aguda e crônica de infecção; (ii) efetivos em dose única ou em poucas doses; (iii) acessíveis aos pacientes, i.e. baixo custo e de fácil aquisição; (iv) sem efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) nenhuma necessidade de hospitalização para o tratamento e (v) não induzir resistência no agente etiológico.^{17,18}

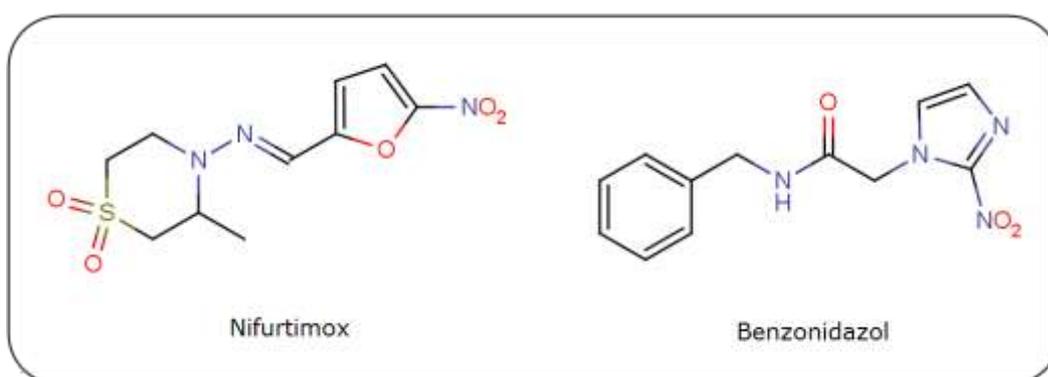


Figura 2.3 - Fármacos utilizados atualmente no tratamento da doença de Chagas¹⁸

Ambos os fármacos curam em torno de 80% dos casos agudos e 20 % dos casos crônicos. Entretanto, são necessários 60 dias de tratamento com 2-3 doses diárias. Nenhum deles é acessível aos pacientes, pelo menos não no Brasil, onde o Nifurtimox não é disponibilizado e o Benzonidazol é restrito às clínicas especializadas, que requerem monitoramento médico durante todo o tratamento.

Tanto o fármaco Nifurtimox quanto o Benzonidazol induzem sérios efeitos colaterais tais como anorexia, perda de peso, mudanças psicológicas, excitabilidade, tremores musculares, sonolência, alucinações, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia e convulsões. Além disso, algumas cepas do parasito são resistentes ao tratamento. Principal motivo pelo desuso do Benzonidazol no Brasil.¹⁷

Devido à natureza empírica da descoberta e desenvolvimento do Nifurtimox e do Benzonidazol, estes fármacos foram registrados e utilizados clinicamente por vários anos sem um entendimento claro dos seus mecanismos de ação. Hoje, se sabe que a ação antiparasitária do Nifurtimox está associada com a produção de grandes quantidades de espécies reativas tóxicas de oxigênio (ROS, tais como anions superóxidos e peróxido de hidrogênio), resultantes da reação do oxigênio com metabólitos nitro-ânions instáveis produzidos a partir grupo nitro presente na molécula.¹⁹ Entretanto, a citotoxicidade do Benzonidazol não está associada com a geração de níveis significantes de ROS; ao invés, está provavelmente associada ao estresse redutivo, o qual envolve modificações covalentes de macromoléculas por intermediários de nitro-redução.^{20 -22}

2.5. Vias metabólicas alvos de novos agentes quimioterápicos

Dadas as limitações significativas dos fármacos atualmente disponíveis, particularmente para o tratamento da fase crônica da doença, novas abordagens para a quimioterapia da doença de Chagas têm sido desenvolvidas. Dentre elas a busca por novos processos metabólicos essenciais para a sobrevivência dos parasitos e que estão ausentes nos mamíferos. Nas últimas duas décadas, os novos conhecimentos adquiridos a partir do estudo das vias bioquímicas do *T. cruzi* têm permitido a identificação de uma série de alvos para serem usados no tratamento da doença de Chagas. Os tópicos que seguem fornecem uma descrição sobre algumas das vias metabólicas nos quais o planejamento de novos agentes tripanocidas têm se focado.

2.5.1. Via de biossíntese de ergosterol

Estudos têm demonstrado que o *T. cruzi*, assim como a maioria dos fungos e bactérias, necessita de esteróis específicos para a viabilidade e proliferação celular em todo seu ciclo de vida. Várias etapas da biossíntese de ergosterol vêm sendo validadas *in vitro*^{23,24} e enzimas pertencentes a esta via metabólica propostas como alvos para o planejamento de agentes tripanocidas. Dentre elas a Hidroximetilglutaril-coenzima A redutase (HMG-coA redutase),²⁵ a Farnesil pirofosfato sintase (FPPS),²⁶ Oxidosqualeno ciclase (OSC),²⁷ Esqualeno epoxidase (SQO),²⁸ Esqualeno sintase (SQS), 24-C-sterol metiltransferase (24-SMT)²⁹ e C14 α -sterol demetilase (CYP51).³⁰

Inibidores potentes e seletivos da enzima C14 α -sterol demetilase derivados de triazóis, tais como os compostos D0870 (AstraZeneca Pharmaceuticals) e o Posaconazol (SCH 56592, Noxafil®, Shering-Plough Institute), cujas estruturas são mostradas na Figura 2.4, se mostraram capazes de induzir a cura parasitológica das fases aguda e crônica, e de erradicar cepas do *T. cruzi* resistentes ao Nifurtimox e ao Benzonidazol em camundongos, mesmo com o hospedeiro imunologicamente deficiente.

De todos dos compostos planejados tendo como alvo a via de biossíntese de ergosterol, o Posaconazol encontra-se mais avançado nos estudos clínicos específicos para o tratamento da fase crônica da doença de Chagas, com início dos testes previstos para o começo de 2010. Este será o primeiro fármaco planejado racionalmente para o tratamento dessa doença a entrar na fase Clínica de desenvolvimento.²⁴

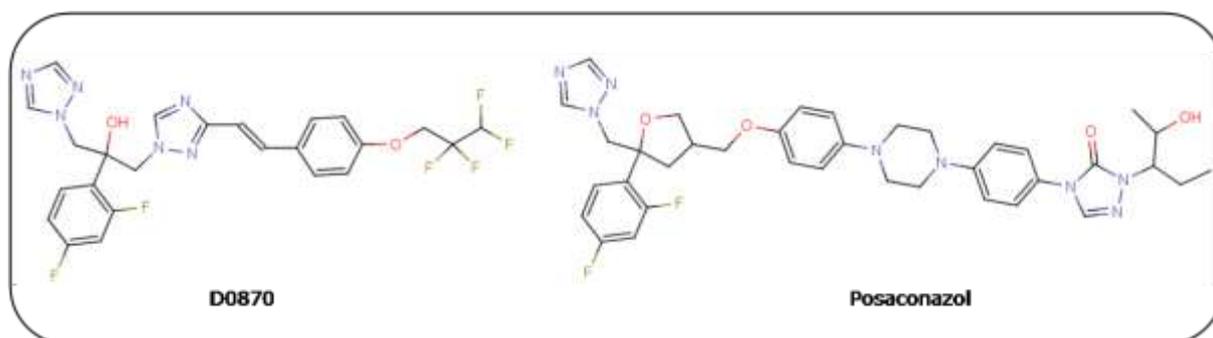


Figura 2.4 - Derivados de triazóis inibidores da enzima C14 α -sterol demetilase²⁴

2.5.2. Via de digestão proteolítica

O *T. cruzi* possui uma enzima Cisteíno protease ortóloga da Catepsina-L, proteína envolvida numa série de processos metabólicos terapeuticamente relevantes em humanos, chamada Cruzipaina e também conhecida como gp51/57 e Cruzaína (enzima recombinante). A Cruzaína é responsável pela maior parte da atividade proteolítica em todos os estágios do ciclo de vida do parasito.^{31,32} Inibidores seletivos desta proteína, tais como o N-metil-piperazina-ureia-F-hF-vinil-sulfona-fenil, conhecido como CRA-3316 ou K-777 (Figura 2.5), bloqueiam a proliferação *in vitro* das formas epimastigotas extracelulares, amastigotas intracelulares e também a transformação das epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas (vide Figura 2.2). Estes compostos também são capazes de reduzir significativamente os níveis de parasitemia e prolongar a sobrevivência de camundongos na fase aguda e crônica da doença de Chagas, com mínima toxicidade.³³

Nos últimos anos novos esqueletos de compostos-líderes para inibidores da Cruzaína, seletivos e potentes contra o *T. cruzi* em ensaios *in vitro* têm sido identificados.^{34,35,36} Estudos de SAR com inibidores não-peptídicos contendo esqueletos de tiossemicarbazona e semicarbazona têm sido explicados com base na estrutura e mecanismo da enzima.^{36,37} Além disso, modelos para predição da seletividade de inibidores da Cruzaína em detrimento da Catepsina-L também foram construídos.³⁸

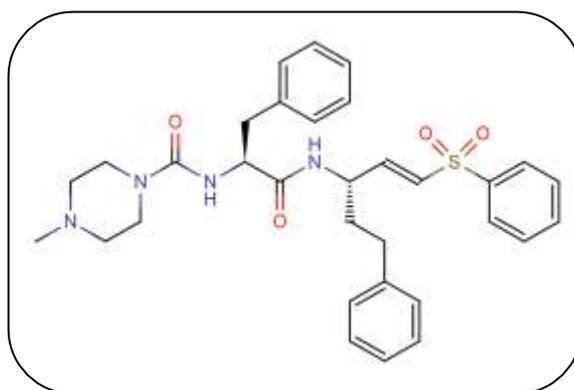


Figura 2.5 - Estrutura do composto K-777, potente inibidor da enzima Cruzaína

Os resultados obtidos em estudos envolvendo a Cruzaína confirmam que esta é um alvo para a quimioterapia da doença de Chagas. Consistente com este fato, várias patentes envolvendo inibidores de Cruzaína como agentes tripanocidas têm sido registrados (e.g., US Patent 6958358).³⁹ Entretanto, o potencial de inibidores

peptídeo-miméticos (tal como o composto K-777) como fármacos permanece não muito claro. Enquanto isso, o desenvolvimento de novos inibidores não-peptídicos ainda se encontra nas fases iniciais.

2.5.3. Via de síntese e metabolismo da Tripanotiona

Vários grupos de pesquisa, utilizando estratégias complementares, têm identificado as enzimas envolvidas na síntese e no metabolismo redox da Tripanotona (N^1, N^6 -bis(glutationil)-espermidina, Figura 2.6) como potenciais alvos terapêuticos.^{40,41,42} Esta via bioquímica é única em protozoários tripanossomatídeos, nos quais substitui a Glutaciona e a Glutaciona redutase (encontradas em humanos) como o principal sistema redox intracelular de tióis, tornando-a um alvo promissor para a quimioterapia antiparasitária.³² Diversas enzimas desta via foram validadas geneticamente,⁴¹ incluindo a Tripanotona redutase (TR) e a Tripanotona sintase (TS) e muitas classes de compostos identificados como inibidores da TR e agentes tripanocidas *in vitro*.⁴³⁻⁴⁷ Entretanto, ainda existe a falta de evidências convincentes para atividade seletiva desses compostos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Dois inibidores *in vitro* conhecidos da TR, a Tioridazina e a Clomipramina (Figura 2.6), ambos já utilizados como fármacos antidepressivos, são capazes de reduzir a parasitemia, aumentar a sobrevivência e evitar danos cardíacos em camundongos durante a fase aguda da doença de Chagas.^{43,48-50} Porém, nenhuma cura parasitológica ou seletividade contra enzima no parasito foi demonstrada e a base molecular para estes efeitos não são claras.

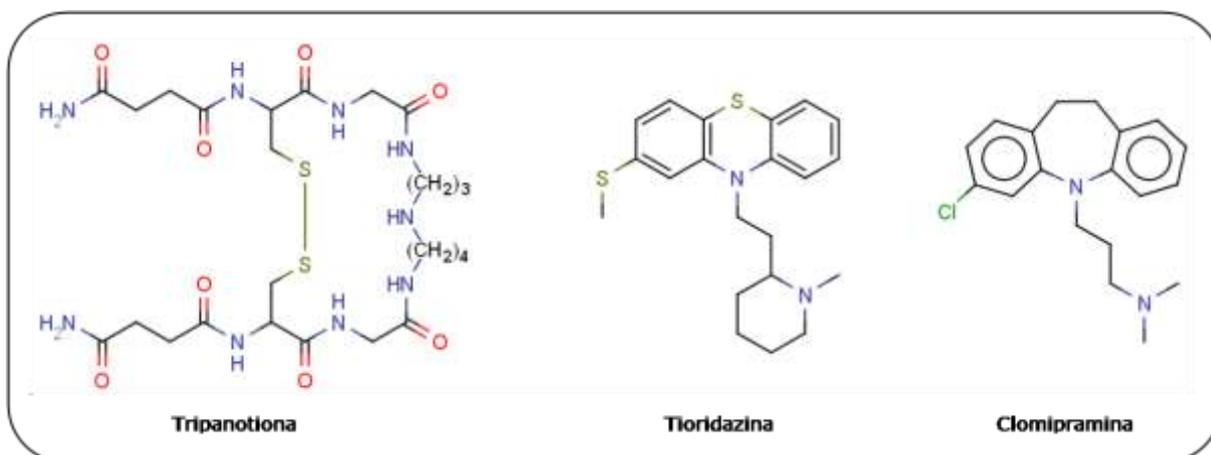


Figura 2.6 - Estruturas moleculares da Tripanotona e dos inibidores da enzima Tripanotona redutase Tioridazina e a Clomipramina

Apesar de diversos estudos evidenciarem o caráter essencial da síntese e do metabolismo da Tripanotona para sobrevivência do parasito, ainda é difícil estabelecer quais enzimas da via são de fato farmacologicamente tratáveis do ponto de vista do planejamento de novos fármacos. Algumas características moleculares da TR tais como a presença de uma cavidade hidrofóbica ampla no sítio ativo e os altos níveis de atividade apresentada por esta enzima no parasito a tornam um alvo longe do ideal.^{51,52} Entretanto, a TS, outro alvo importante da via, pode ser uma alternativa interessante.

2.5.4. Biossíntese de Nucleotídeos

Os nucleotídeos desempenham uma variedade de funções em todas as células. Além de serem os precursores de DNA e RNA, eles são transportadores essenciais de energia química, como o trifosfato de adenosina (ATP), são cofatores de enzimas, como a Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e a Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), alguns nucleotídeos como a uridina difosfato-glicose (UDPglicose) são ativadores de intermediários biossintéticos e outros, como a adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) atuam como mensageiros celulares. Essas funções fazem dos nucleotídeos moléculas extremamente importantes para vida celular.⁵³

Os nucleotídeos são formados por uma molécula de açúcar (pentose), uma base nitrogenada e um ou mais grupos fosfato (Figura 2.7). As bases nitrogenadas podem ser purínicas (Adenina (A) e Guanina (G)) ou pirimidínicas (Citosina (C), Timina (T) e Uracila (U)), enquanto a pentose pode ser uma ribose ou uma desoxirribose.⁵³

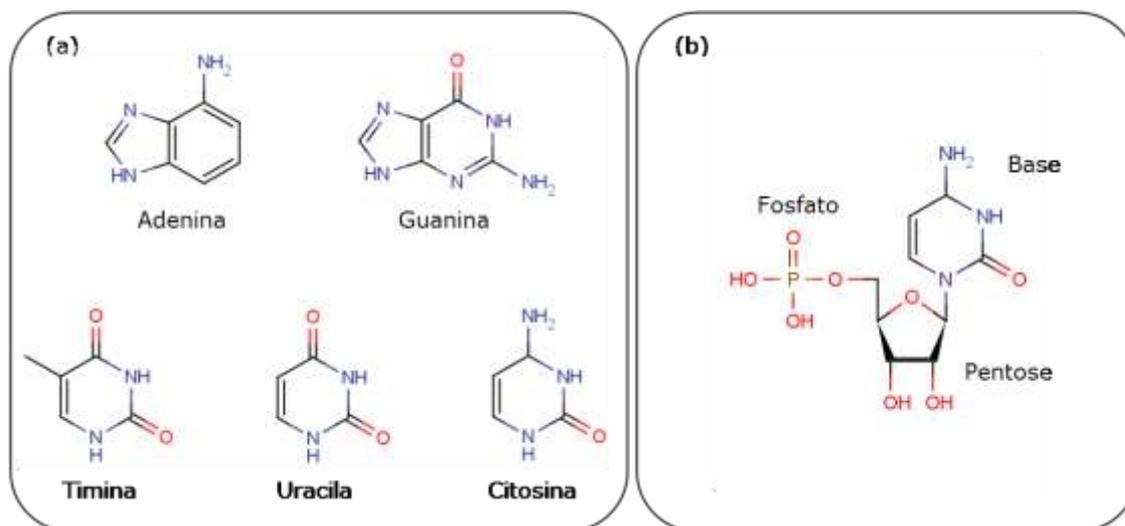


Figura 2.7 - Estrutura química dos nucleotídeos. (a) bases nitrogenadas: Parte superior bases purínicas; parte inferior bases pirimidínicas. (b) estrutura química de um nucleotídeo monofosfato

A biossíntese de nucleotídeos pode ocorrer de duas maneiras distintas na natureza: utilizando bases nitrogenadas (purínicas ou pirimidínicas) sintetizadas pelas vias *de novo* ou obtidas através das *vias de salvação*, conhecidas também como vias de recuperação. Devido à importância destas vias metabólicas para obtenção de bases nitrogenadas, ambas têm sido estudadas como alvos para o planejamento de agentes tripanocidas.⁵³

2.5.4.1. Via de salvação de purinas

Os tripanossomatídeos são absolutamente deficientes da biossíntese *de novo* de purinas e, por esta razão, tais compostos são obtidos através da recuperação do seu meio de crescimento ou do mamífero hospedeiro através da via de salvação de purinas. Uma enzima chave desta via é a Hipoxantina-guanina fosforibosil transferase (HFPRT), a qual vem sendo usada a vários anos como alvo validado para o tratamento de Gota em humanos, utilizando-se o composto Allopurinol (Figura 2.8).³² Em tripanossomatídeos, este composto age como um análogo de purina e é incorporado, através da HFPRT, ao DNA. Desta forma, provoca a interrupção da síntese de RNA e, conseqüentemente, de proteínas essenciais para sua sobrevivência.⁴²

O Allopurinol foi mostrado ser ativo na fase aguda da doença de Chagas em camundongos. Entretanto, foram observadas diferenças entre as susceptibilidades de diferentes cepas do parasito frente ao composto. Outros inibidores capazes de bloquear a proliferação da forma amastigota intracelular foram testados. Porém ainda não há relatos de testes de eficácia destes compostos em modelos animais.³²



Figura 2.8 - Estrutura molecular do Allopurinol

A inibição da HGPRT de *T. cruzi* permanece como uma abordagem atrativa para a quimioterapia específica contra o parasito, mas tem havido pouco interesse

no desenvolvimento sistemático de novos inibidores desta enzima como candidatos a fármacos.

2.5.4.2. *Via de síntese de novo de pirimidinas*

Enquanto um grande número de parasitos é incapaz de sintetizar **nucleotídeos de purína** através da biossíntese *de novo* e utilizam a via de recuperação para este propósito, a situação inversa ocorre para a síntese de **nucleotídeos de pirimidinas**, ou seja, muitos deles só conseguem obter estes compostos através da biossíntese *de novo*, pois são deficientes da via de salvação para este fim. Entre estes, diversos microrganismos que afetam a saúde humana como, por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori* (responsável por úlceras estomacais), o parasito *Plasmodium falciparum* (causador da malária) não possuem a via de salvação para obtenção de nucleotídeos de pirimidina.⁵⁴ Assim, as enzimas que participam desta via metabólica são consideradas potenciais alvos para o planejamento de fármacos.⁵⁵

Nos últimos anos a enzima Diidroorotato desidrogenase (DHODH), que catalisa a quarta etapa da síntese de novo de nucleotídeos de pirimidina, vem sendo estudada como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra parasitoses causadas por tripanossomatídeos.^{56,57} Experimentos recentes visando a validação da DHODH do *T. cruzi* (TcDHODH) mostraram que as epimastigotas, forma replicativa do parasito no inseto vetor, são totalmente dependentes da síntese de novo de pirimidinas para sobrevivência.⁵⁵

Apesar do potencial da enzima DHODH como alvo terapêutico, apenas a enzima de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) têm sido objeto de vários estudos para o planejamento de inibidores capazes intervirem na via metabólica de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas e atuarem como agentes quimioterápicos contra a Malária.^{58,59} Alguns desses, baseados em fármacos já disponíveis para o tratamento de artrite reumatóide ou imunossupressivos, os quais tem como alvo a enzima DHODH de humanos (HsDHODH).^{59,60} Entretanto, devido a diferenças (discutidas em detalhes no Capítulo 3) no mecanismo de ação e também estruturais entre a enzima TcDHODH e suas ortólogas PfDHODH e HsDHODH é pouco provável

que estes compostos tenham utilidade como inibidores da enzima de tripanossomatídeos.⁵⁷

A enzima TcDHODH foi escolhida como um dos alvos estudados neste trabalho para o planejamento de inibidores enzimáticos e, por esse motivo, uma descrição mais detalhada sobre a reação na qual está envolvida, seu mecanismo, bem como suas características estruturais relevantes será dada no Capítulo 3.

2.5.5. Via glicolítica

Dentre os vários processos metabólicos importantes para o parasito, a glicólise é também considerada um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos contra os tripanossomatídeos. Isso porque este processo bioquímico exerce um papel essencial no fornecimento de energia, na forma de ATP (Adenosina tri-fosfato), para o parasito. Nos tripanossomatídeos a glicólise apresenta uma característica única: ela ocorre em uma organela especializada chamada de *glicossomo*.⁶¹ No glicossomo estão presentes sete das dez enzimas que participam da conversão da glicose em piruvato: Hexocinase (HK), Glicose 6-fosfato-isomerase; 6-fosfofrutocinase (PFK), 1,6-difosfato aldolase (ALD), Triosefosfato isomerase (TIM), Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a Fosfoglicerato cinase (PGK), respectivamente.⁶¹

Bakker *et al.* identificaram os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas utilizando modelos matemáticos para calcular quais as etapas da glicólise precisam ser menos inibidas para induzir a inibição de certa quantidade do fluxo glicolítico.⁶² A Tabela 2.1 reporta a porcentagem em que cada enzima da glicólise precisa ser inibida para que o fluxo glicolítico diminua em 50%. O transporte de glicólise aparece como sendo o alvo mais promissor, já que a inibição de apenas 51% dessa etapa é suficiente para inibir o fluxo glicolítico em 50%. As enzimas ALD, glicerol-3-fosfato desidrogenase (GDH) e PGK também aparecem como sendo alvos promissores para o planejamento de novos fármacos, já que elas também exercem um controle significativo do fluxo glicolítico.

Tabela 2.1 - Enzimas envolvidas no controle da glicólise, cuja inibição individual leva a uma redução de 50% fluxo glicolítico

Enzima*	Inibição necessária (%)
Transporte de glicólise	51
ALD	76
GDH	83
GAPDH	84
PGK	85
HK	93
PFK	93
PYK	97

ALD, Frutose-1,6-difosfato aldolase; GDH, Glicerol-3-fosfato desidrogenase; GAPDH, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato cinase; HK, Hexocinase; PFK, 6-fosfofruto-cinase; PYK, Piruvato cinase

Além das enzimas ALD, GDH e PGK, a enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase também exerce papel significativo no controle do fluxo glicolítico. A inibição dessa enzima em 84% provoca a redução do fluxo glicolítico em 50%. Outro aspecto que merece destaque é que um modelo elaborado da glicólise em eritrócitos humanos mostrou que uma deficiência de 95% das enzimas ALD, PGK e GAPDH não provoca qualquer sintoma clínico.⁶²

Extensos estudos do metabolismo do *T. brucei* mostraram que a forma tripomastigota utiliza a glicólise como sua única fonte para a obtenção de energia.^{63,64} Engel *et al.* mostraram que uma cultura da forma amastigota do *T. cruzi* possui um metabolismo essencialmente glicolítico, e que ela adquire a habilidade de oxidar substratos, tais como aminoácidos, somente após a diferenciação para a forma epimastigota.⁶⁵

A alta dependência da via glicolítica para a obtenção de energia pelos tripanossomatídeos, a organização particular das enzimas dessa via no glicossomo e a ocorrência de características únicas tanto estruturais quanto no mecanismo de muitas enzimas envolvidas na glicólise oferece uma série de oportunidades para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas. Esse conjunto de características explica o motivo pelo qual as enzimas da via glicolítica se tornaram alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas

Assim como a enzima TcDHODH a enzima TcGAPDH também foi escolhida como alvo de estudo neste trabalho, por isso uma descrição mais detalhada sobre alguns aspectos relevantes acerca desse importante alvo na busca por agentes tripanocidas será dada no Capítulo 3.

2.6. Conclusões

Apesar dos impactos socioeconômicos negativos, da diminuição da qualidade de vida e dos efeitos severos ao organismo causados pela doença de Chagas, esta acaba de completar 100 anos de sua descoberta sem que haja um tratamento eficaz e seguro. A busca por novas terapias realizadas nos últimos anos focando em vias metabólicas importantes para a sobrevivência do parasito tem se mostrado eficiente, levando o Posaconazol para os estudos clínicos em 2010, como uma grande promessa, principalmente para o tratamento da fase crônica da doença, onde os efeitos são, na maioria das vezes, letais. Além disso, a validação de alvos enzimáticos pertencentes a outras vias como a TcGAPDH (via glicolítica) e a TcDHODH (biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina) tem evidenciado suas relevâncias como objeto de estudo para o planejamento de compostos com atividade tripanocida e, por esta razão, foram escolhidas como ponto central na realização deste trabalho.

2.7. Referências

1. CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
2. BARRET, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
3. HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
4. MASLOV, D.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.
5. BALAKRISHNAN, I.; ZUMLA, A. African trypanosomiasis. In: GILLESPIE, S. H.; PEARSON, R. D. (Eds.). **Principles and practice of clinical parasitology**. Chichester: John Wiley, 2001. p. 315-334.

6. CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.
7. MILES, M. A. Control of chagas disease. report of a WHO expert committee : Geneva: World Health Organization. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 6, p. 713-714, 1991.
8. BEARD, C. B. Control of chagas disease: second report of the WHO expert committee. WHO technical report séries. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 6, p. 643, 2002.
9. WHO/CTD. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2009. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/Chagas/en/index.html>. Acesso em: 22 de dez. 2009.
10. COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
11. DOENÇA de chagas: 100 anos de sua descoberta. Disponível em: <<http://miriamsalles.info/wp/?p=3512>>. Acesso em: 20 dez. 2009.
12. YOSHIDA, N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 101-107, 2009.
13. CHAGAS disease. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chagas_disease>. Acesso em: 20 dez. 2009.
14. LINÃRES, G. E.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 335-360, 2006.
15. MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, A.-L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Med**, v. 6, n. 2, p. e1000030, 2009.
16. PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M. A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 727-740, 2005.
17. COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: A proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.
18. SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 13, n. 1, p. 105-121, 2009.
19. DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. **Federation Proceedings**, v. 45, n. 10, p. 2471-2476, 1986.
20. DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, n. 1, p. 1-27, 1990.
21. MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEON, W.; STOPPANI, A. O. M. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 218, n. 2, p. 585-591, 1982.
22. DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. 223-238, 1984.

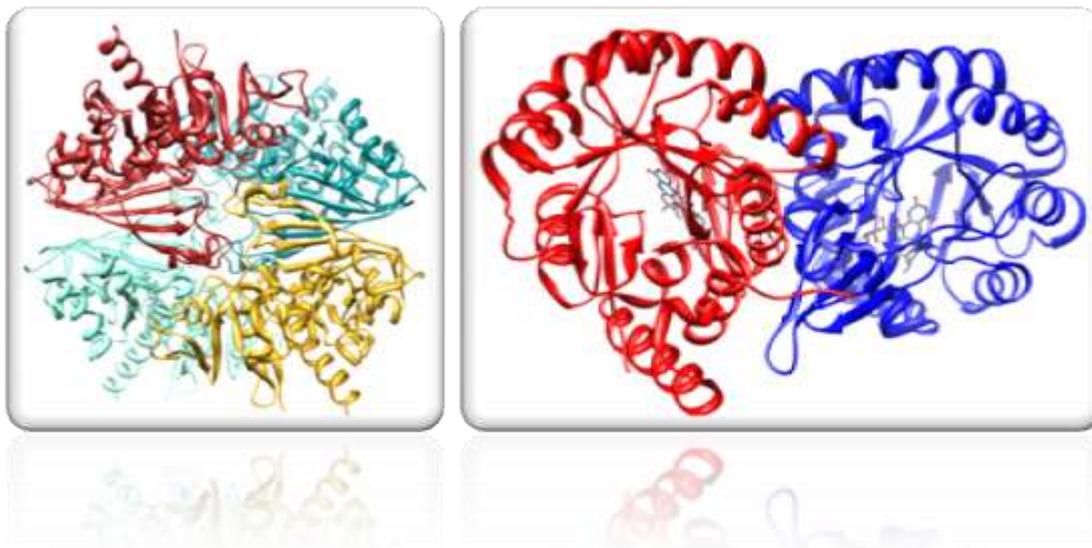
23. URBINA, J.A. Chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**. v. 8, n. 4, p. 287-295.
24. URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, 2010. In press.
25. FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; GARIN, C.; ISOLA, E.; BRENNER, R. R.; RASMUSSEN, L. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth and sterol biosynthesis by lovastatin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 166, n. 3, p. 1441-1445, 1990.
26. MONTALVETTI, A.; BAILEY, B. N.; MARTIN, M. B.; SEVERIN, G. W.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. Bisphosphonates are potent Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 36, p. 33930-33937, 2001.
27. BUCKNER, F. S.; GRIFFIN, J. H.; WILSON, A. J.; VAN VOORHIS, W. C. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1210-1215, 2001
28. MALDONADO, R. A.; MOLINA, J.; PAYARES, G.; URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 37, n. 6, p. 1353-1359, 1993.
29. MAGARACI, F.; JIMENEZ; RODRIGUES, C.; RODRIGUES, J. C. F.; BRAGA, M. V.; YARDLEY, V.; DE LUCA-FRADLEY, K.; CROFT, S. L.; DE SOUZA, W.; RUIZ-PEREZ, L. M.; URBINA, J.; PACANOWSKA, D. G.; GILBERT, I. H. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 22, p. 4714-4727, 2003.
30. BUCKNER, F.; YOKOYAMA, K.; LOCKMAN, J.; AIKENHEAD, K.; OHKANDA, J.; SADILEK, M.; SEBTI, S.; VAN VOORHIS, W.; HAMILTON, A.; GELB, M. H. A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 25, p. 15149-15153, 2003.
31. CAZZULO, J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1261-1271, 2002.
32. URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
33. ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 188, n. 4, p. 725-734, 1998.
34. CAFFREY, C. R.; SCHANZ, M.; NKEMGU-NJINKENG, J.; BRUSH, M.; HANSELL, E.; COHEN, F. E.; FLAHERTY, T. M.; MCKERROW, J. H.; STEVERDING, D. Screening of acyl hydrazide proteínase inhibitors for antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 19, n. 3, p. 227-231, 2002.
35. BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6404-6410, 2008.
36. DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the *Trypanosomal* cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002.

37. GUIDO, R. V. C.; TROSSINI, G. H. G.; CASTILHO, M. S.; OLIVA, G.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 964-973, 2008.
38. FREITAS, R. F.; OPREA, T. I.; MONTANARI, C. A. 2D QSAR and similarity studies on cruzain inhibitors aimed at improving selectivity over cathepsin L. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 838-853, 2008.
39. URBINA, J. A. New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 13, n. 5, p. 661-669, 2005.
40. FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in Kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 695-729, 1992.
41. SCHMIDT, A., KRAUTH-SIEGEL, R.L. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1239-1259, 2002.
42. PAULINO, M.; IRIBARNE, F.; DUBIN, M.; AGUILERA-MORALES, S.; TAPIA, O.; STOPPANI, A. O. M. The Chemotherapy of Chagas' disease: an overview. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 499-519, 2005.
43. GUTIERREZ-CORREA, J.; FAIRLAMB, A. H.; STOPPANI, A. O. M. Trypanosoma Cruzi trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. **Free Radical Research**, v. 34, n. 4, p. 363-378, 2009.
44. RIVAROLA, H. W.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Trypanosoma cruzi Trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas disease evolution. **Current Drug Targets - Cardiovascular & Haematological Disorders**, v. 2, p. 43-52, 2002.
45. MEIERING, S.; INHOFF, O.; MIES, J.; VINCEK, A.; GARCIA, G.; KRAMER, B.; DORMEYER, M.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Inhibitors of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase revealed by virtual screening and parallel synthesis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 15, p. 4793-4802, 2005.
46. OLIVEIRA, R B; VAZ, A. B. M.; ALVES, R. O.; LIARTE, D. B.; DONNICI, C. L.; ROMANHA, A. J.; ZANI, C. L. Arylfurans as potential Trypanosoma cruzi trypanothione reductase inhibitors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 169-173, 2006.
47. CZECHOWICZ, J. A.; WILHELM, A. K.; SPALDING, M. D.; LARSON, A. M.; ENGEL, L. K.; ALBERG, D. G. The Synthesis and inhibitory activity of dethiotrypanothione and analogues against trypanothione reductase. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 72, n. 10, p. 3689-3693, 2007.
48. RIVAROLA, H. W.; FERNANDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; SULIGOY, M.; PALMA, J. A.; PAGLINI-OLIVA, P. Thioridazine treatment modifies the evolution of Trypanosoma cruzi infection in mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 93, n. 7, p. 695 - 702, 1999.
49. LO PRESTI, M. S.; RIVAROLA, H. W.; BUSTAMANTE, J. M.; FERNÁNDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; FRETES, R.; GEA, S.; PAGLINI-OLIVA, P. A. Thioridazine treatment prevents cardiopathy in Trypanosoma cruzi infected mice. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 6, p. 634-636, 2004.
50. RIVAROLA, H. W.; BUSTAMANTE, J. M.; LO PRESTI, S.; FERNÁNDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; GEA, S.; FRETES, R.; PAGLINI-OLIVA, P. Trypanosoma cruzi: Chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. **Experimental Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 80-86, 2005.

51. BOND, C. S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, n. 1, p. 81-89, 1999.
52. KHAN, M. O. F.; AUSTIN, S. E.; CHAN, C.; YIN, H.; MARKS, D.; VAGHJANI, S. N.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; DOUGLAS, K. T. Use of an additional hydrophobic binding site, the Z site, in the rational drug design of a new Cclass of stronger trypanothione reductase inhibitor, Quaternary Alkylammonium Phenothiaziness. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 16, p. 3148-3156, 2000.
53. NELSON, D. L.; COX, M. M., Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.). **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p. 862-880.
54. ANNOURA, T.; NARA, T.; MAKIUCHI, T.; HASHIMOTO, T.; AOKI, T. 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, 2005.
55. CHRISTOPHERSON, R. I.; LYONS, S. D.; WILSON, P. K. Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 11, p. 961-971, 2002.
56. CORDEIRO, A. T.; FELICIANO, P. R.; NONATO, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section F**, v. 62, n. 10, p. 1049-1051, 2006.
57. ARAKAKI, T. L.; BUCKNER, F. S.; GILLESPIE, J. R.; MALMQUIST, N. A.; PHILLIPS, M. A.; KALYUZHNIY, O.; LUFT, J. R.; DETITTA, G. T.; VERLINDE, C. L. M. J.; VOORHIS, W. C. V.; HOL, W. G. J.; MERRITT, E. A. 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, 2008.
58. HEIKKILA, T.; RAMSEY, C.; DAVIES, M.; GALTIER, C.; STEAD, A. M. W.; JOHNSON, A. P.; FISHWICK, C. W. G.; BOA, A. N.; MCCONKEY, G. A. Design and synthesis of potent Inhibitors of the malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 186-191, 2006.
59. HURT, D. E.; WIDOM, J.; CLARDY, J. Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor. **Acta Crystallographica Section D**, v. 62, n. 3, p. 312-323, 2006.
60. BOA, A. N.; CANAVAN, S. P.; HIRST, P. R.; RAMSEY, C.; STEAD, A. M. W.; MCCONKEY, G. A. Synthesis of brequinar analogue inhibitors of malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 6, p. 1945-1967, 2005.
61. VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.
62. BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOLFF, H. V. What controls glycolysis in bloodstream form Trypanosoma brucei? **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.
63. OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 127-151, 1987.
64. OPPERDOES, F. R. Biochemical peculiarities of trypanosomes, African and South American. **British Medical Bulletin**, v. 41, n. 2, p. 130-136, 1985.

65. ENGEL, J. C.; CAZZULO, B. M. F.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1987.
66. WILLSON, M., SANEJOUAND, Y. H., PERIE, J., HANNAERT, V., OPPERDOES, F. R. Sequencing, modeling, and selective inhibition of *Trypanosoma brucei* hexokinase. **Chemistry and Biology**, v. 9, n. 7, p. 839-847, 2002.
67. CORDEIRO, A. T.; FELICIANO, P. R.; NONATO, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section F**, v. 62, n. 10, p. 1049-1051, 2006.
68. NYASSE, B.; NONO, J.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. Trypanocidal activity of bergerin, the major constituent of *Flueggea virosa*, on *Trypanosoma brucei*. **Pharmazie**, v. 59, n. 6, p. 492-494, 2004.
69. CLAUSTRE, S.; DENNIER, C.; GHAZAL, F. L.; LOUGARE, A.; LOPEZ, C.; CHEVALIER, N.; MICHELS, P. A. M.; PERRIE, J.; WILSON, M. Exploring the active site of *Trypanosoma brucei* phosphofructokinase by inhibition studies: specific irreversible inhibition. **Biochemistry**, v. 41, n. 32, p. 10183-10193, 2002.
70. DAX, C.; DUFFIEUX, F.; CHABOT, N.; COINCON, M.; SYGUSCH, J.; MICHELS, P. A. M.; BLONSKI, C. Selective irreversible inhibition of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 1499-14502, 2006.
71. ILLANA, V. O.; MONTFORT, R. P.; CALAHORRA, F. L.; COSTAS, M.; ROMERO, A. R.; PUYOU, M. T. G.; PUYOU, A. G. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. **Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 2556-2560, 2006.
72. BRESSI, J. C.; CHOE, J.; HOUGH, M. T.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. V.; VERLINDE, C. L. M. J.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H., Adenosine analogues as inhibitors of *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase: elucidation of a novel binding mode for a 2-amino-N(6)-substituted adenosine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 22, p. 4135-4150, 2000.

Capítulo 3



Alvos enzimáticos

Neste capítulo são abordados aspectos importantes sobre os dois alvos enzimáticos escolhidos neste trabalho para a seleção e identificação de novos agentes tripanocidas, a enzima Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase e a Diidroorotato desidrogenase. Nesse contexto, serão apresentadas informações a respeito das reações e mecanismos de ambas as enzimas, bem como das suas estruturas e dos seus inibidores conhecidos.

3.1. Enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

3.1.1. Reação e mecanismo

Um dos alvos escolhidos neste trabalho para a busca de novos agentes tripanocidas é a enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH, E.C. 1.2.1.12), uma vez que esta tem sido estudada como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas. A GAPDH catalisa a reação que ocorre na sexta etapa da glicólise, que é a fosforilação oxidativa do *D*-Gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-Bisfosfoglicerato (1,3-BPG) (Figura 3.1).^{1,2}

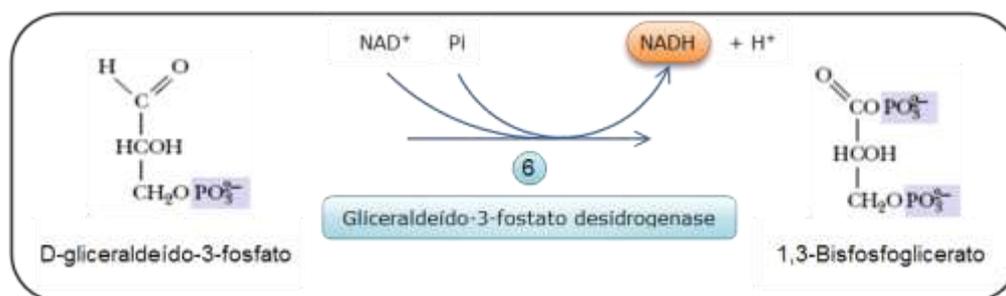


Figura 3.1 - Representação simplificada da fosforilação oxidativa do D-Gliceraldeído-3-fosfato (G3P) a 1,3-Bisfosfoglicetato (1,3-BPG)¹

O mecanismo da reação ocorre no sítio ativo da GAPDH e envolve o ataque nucleofílico da Cisteína catalítica (Cys166), através do seu grupo sulfidrílico (-SH), ao carbono carbonílico do G3P formando um intermediário tetraédrico hemitioacetil (Figura 3.2). Além da Cys166, outro resíduo que participa diretamente da catálise é a His194, atuando como uma base responsável por ativar a Cys166 e também por facilitar a formação do intermediário tetraédrico.³ O intermediário se decompõe pela transferência de um hidreto (H⁻) para o cofator NAD⁺, formando um tioéster altamente energético. A fosforilação desse último ocorre pelo ataque nucleofílico de um fosfato inorgânico e subsequente liberação do produto (1,3-BPG) pela enzima.¹

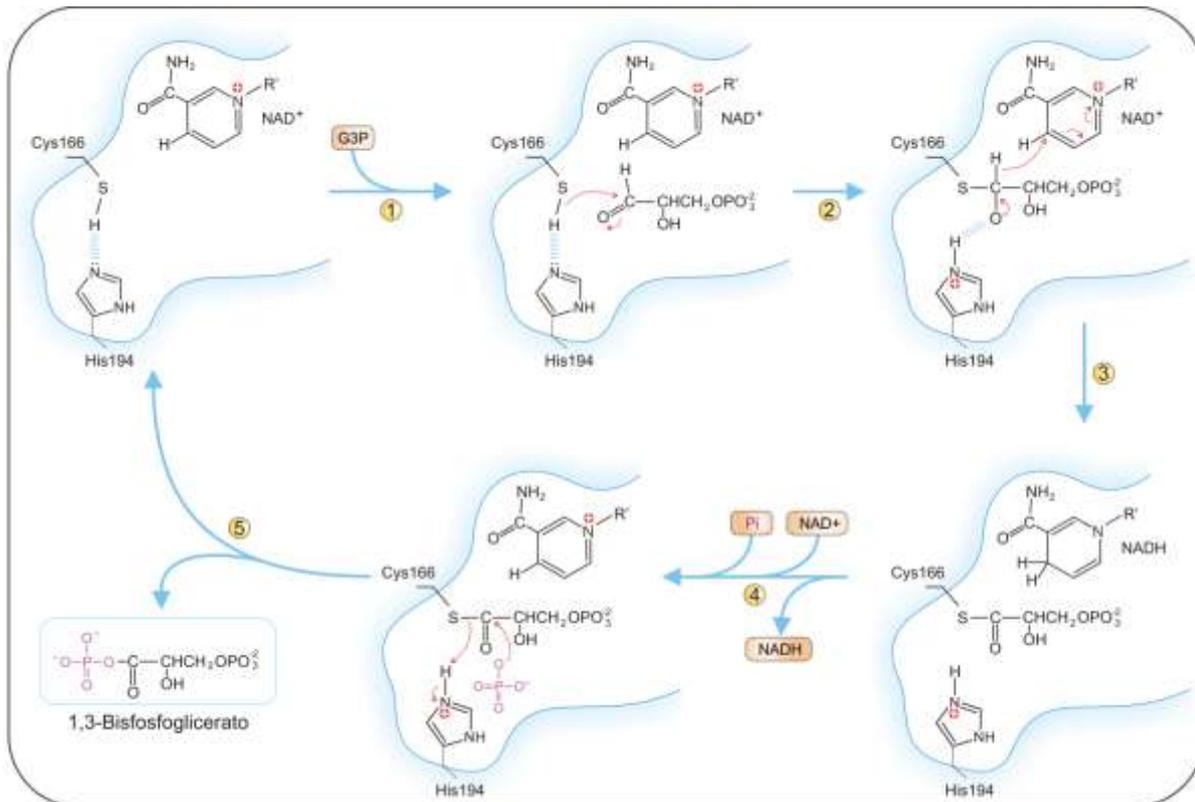


Figura 3.2 - Mecanismo da reação da enzima GAPDH: Após a formação do complexo enzima-substrato (1) ocorre a formação de uma ligação covalente hemitioacetil (2) entre o substrato e o grupo -SH do resíduo de Cisteína, facilitada pela catálise ácido-base com uma base vizinha, a His194. (3) Esse intermediário enzima-substrato é oxidado pelo NAD⁺ ligado no sítio ativo, formando um intermediário covalente acil-enzima, um tioéster. (4) o NADH formado deixa o sítio ativo e é substituído por outra molécula de NAD⁺. A ligação entre o grupo acil e o grupo tiol da enzima tem uma alta energia livre de hidrólise. (5) Essa ligação sofre uma fosforilação (ataque pelo P_i), liberando o produto 1,3-BPG²

3.1.2. Estrutura

A enzima GAPDH tem sido extensivamente estudada e várias estruturas cristalográficas de diferentes parasitos e além da ortóloga presente em humanos estão disponíveis.⁴⁻¹³ Sua estrutura consiste de um homotetrâmero com peso molecular de aproximadamente 156 kDa onde cada subunidade do tetrâmero é composta por dois domínios: o *domínio de ligação do NAD* e o *domínio catalítico* (Figura 3.3 (b)). O domínio do NAD compreende os resíduos 1-150 na extremidade N-terminal e os resíduos 331-359 na extremidade C-terminal (em laranja na Figura 3.3 (b)). Este domínio contém uma alça formada pelos resíduos 66-76, encontrada somente na família de Tripanossomatídeos. Já o domínio catalítico compreende os

resíduos 151-330 (em azul na Figura 3.3 b), incluindo aqueles essenciais para a atividade catalítica, como a Cys166 e a His194.¹⁴

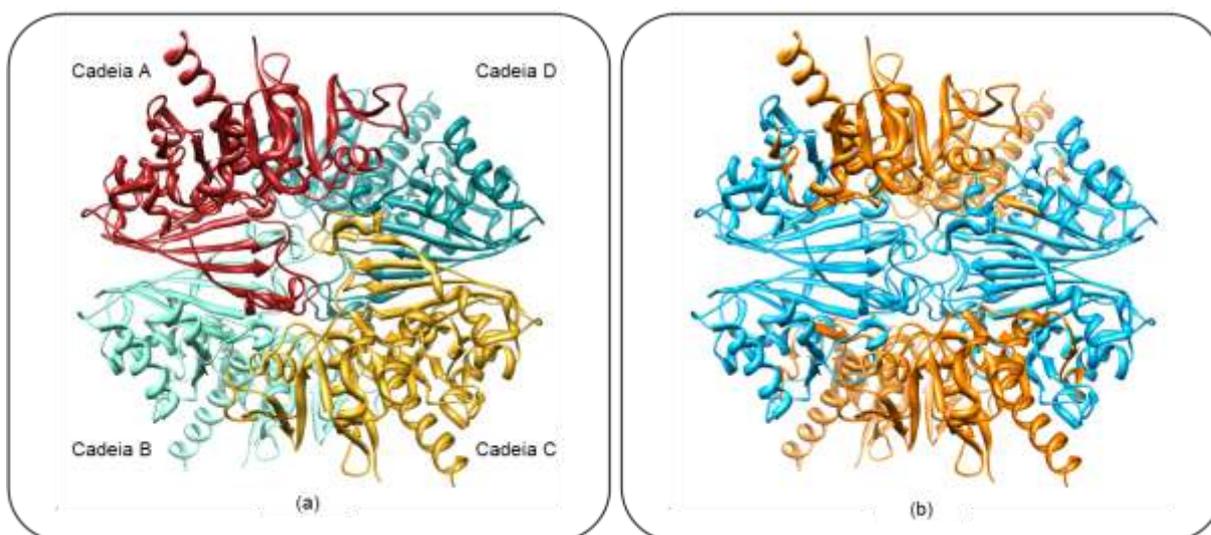


Figura 3.3 - Representação em fita das (a) quatro cadeias da enzima GAPDH e (b) dos domínios dos cofatores NAD⁺ (laranja) e catalíticos (azul). Figura gerada com o programa Chimera¹⁵

Vários trabalhos apontam que o sítio ativo da GAPDH é formado por dois sub-sítios de ligação catiônicos que estão relacionados à ligação do grupo fosfato do substrato (P_s) e do fosfato inorgânico (P_i).^{8,14,16} O sítio P_s é constituído pelos resíduos Thr197, Thr199, Arg249 e a hidroxila da ribose do NAD⁺ (Figura 3.4 (a)). Já o sítio P_i compreende os resíduos Thr167, Thr226, Ser247 e a Arg249.

Inicialmente, acreditava-se que o G3P se ligasse apenas no sítio P_s . Contudo, Kim *et al.* mostraram a existência de um segundo sítio para o fosfato inorgânico chamado *novo sítio* P_i .³ Esse sítio (Figura 3.4 (a)) está situado a cerca de 2,9 Å do sítio P_i original e foi identificado a partir do crescimento de cristais em tampão fosfato. Estudos de modelagem molecular apontam que a localização deste novo sítio é apropriada para o posicionamento e o ataque nucleofílico do fosfato inorgânico ao intermediário tioéster formado durante a catálise.³ Além disso é possível que o substrato G3P também seja capaz de interagir com esse novo sítio.¹⁷

Skarzyński *et al.* propõem que o sítio P_i é o sítio de ligação do fosfato inorgânico na etapa de fosforilação.¹⁸ De acordo com a hipótese formulada por eles, o fosfato ligado ao carbono 3 (C_3) do G3P interage primeiro no sítio P_i durante a etapa de acilação (Figura 3.4 (b)) e então, sai do sítio P_i e vai para o P_s durante a etapa de fosforilação. Este mecanismo é suportado por estudos cinéticos e estruturais da GAPDH de *Escherichia coli* e conhecido como *mecanismo flip-flop*. A

estrutura da TcGAPDH ligada covalentemente com um análogo do substrato também fornece suporte para esse mecanismo.^{8,9} Com a incorporação do novo sítio P_i, propõe-se que o fosfato ligado ao carbono C₃ do G3P se ligue inicialmente nesse sítio e então mude para o sítio P_s antes da transferência de hidreto.¹⁷

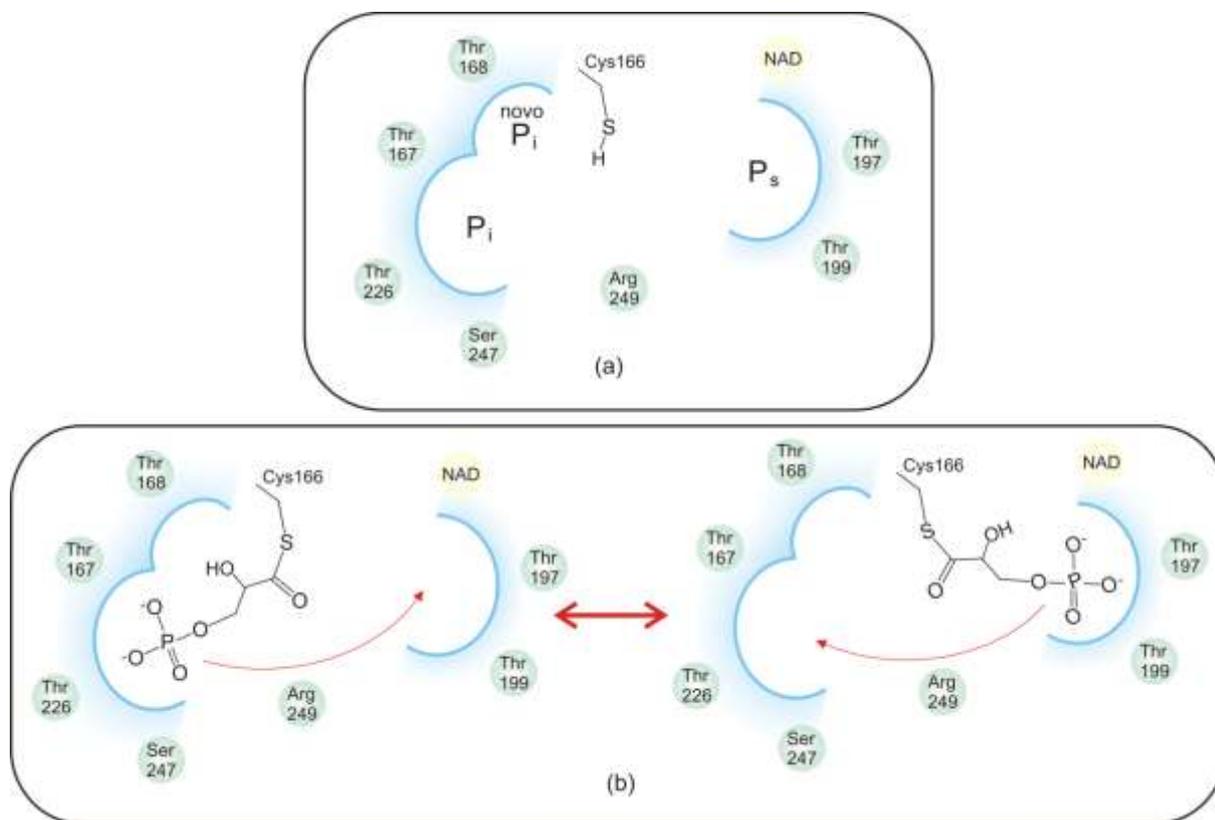


Figura 3.4 - (a) Representação bidimensional da distribuição e localização dos sítios P_s e P_i e novo P_i da enzima GAPDH e (b) posições alternadas adotadas pelo substrato durante a catálise (mecanismo *flip-flop*)

Em outro trabalho recente foi obtida uma estrutura da GAPDH de *Cryptosporidium parvum* na forma holo, complexada com o G3P e com o NAD⁺, graças a uma mutação na qual a Cisteína catalítica foi substituída por uma Serina (Ser).¹⁹ Verificou-se que o fosfato ligado ao C₃ do G3P tem uma preferência por se ligar no novo sítio P_i. Além disso, os resultados evidenciaram que o sítio da GAPDH apresenta uma formidável plasticidade, sendo capaz de acomodar o G3P em múltiplas conformações e posições durante a catálise enzimática.

O resíduo Arg249 tem sido apontado como essencial para a estabilização das cargas em torno do sítio P_s. Esse resíduo também é importante para o posicionamento adequado do substrato no sítio ativo e o controle da saída do produto após o término da reação. Várias estruturas da enzima GAPDH mostram

que na ausência de ligantes a Arg249 forma interações eletrostáticas com o resíduo Asp210. Há evidências de que durante a catálise essa interação seja rompida para que a Arg249 auxilie no correto posicionamento do substrato e na remoção do produto do sítio ativo.¹⁴

3.1.3. Inibidores irreversíveis

Para entender melhor o papel das interações entre as subunidades no mecanismo catalítico da GAPDH, Li *et al.* avaliaram dois haloacetilfosfonatos alquilantes, o cloro- e o bromo-acetilfosfonato (Figura 3.5), como inibidores irreversíveis da Cisteína catalítica em enzimas de diferentes organismos (porco, coelho, galinha, humana).²⁰ Estes inibidores foram planejados para mimetizar o mecanismo de ataque do substrato à Cisteína catalítica. Como resultado foi observado que a GAPDH exibe uma propriedade interessante: a reatividade em apenas dois dos quatro sítios por vez. Assim, quando duas subunidades (ou cadeias) são modificadas pelo agente alquilante, a GAPDH perde toda a sua atividade catalítica. Além disso, verificou-se que o NAD⁺ pode facilitar a alquilação através de interações eletrostáticas ou via indução de mudanças conformacionais.

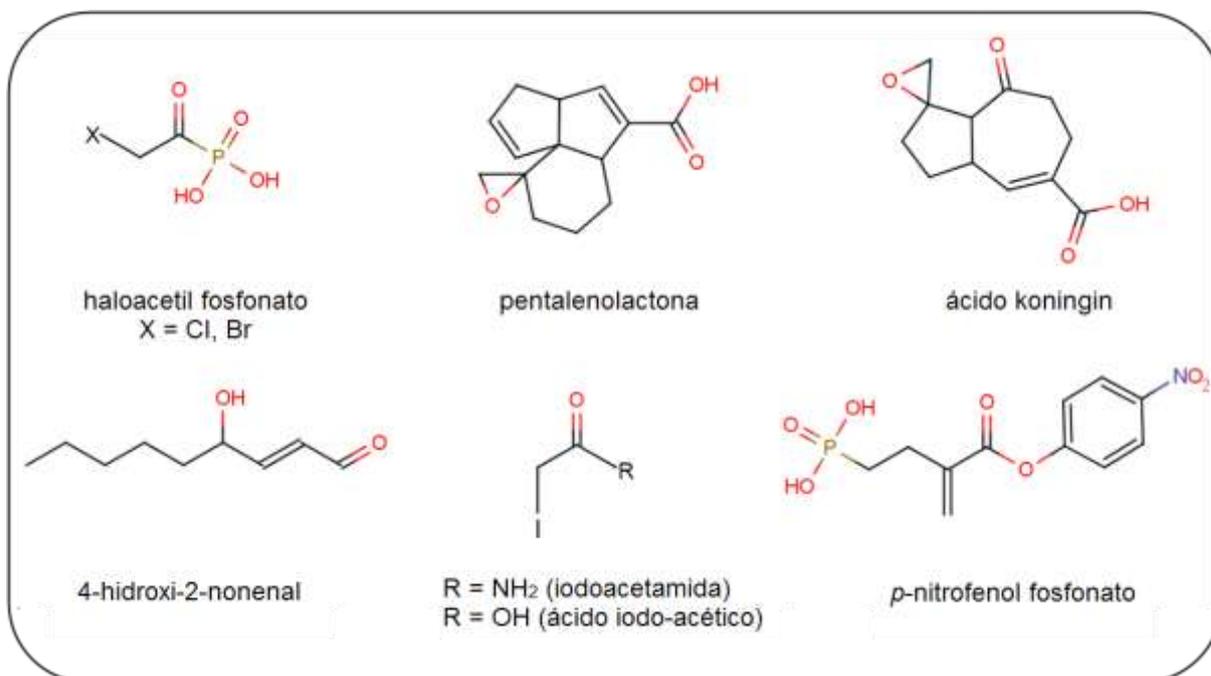


Figura 3.5 - Estruturas representativas das classes de inibidores irreversíveis da GAPDH de *T. cruzi*

Cane *et al.* observaram que a incubação da GAPDH de coelho com o antibiótico sesquiterpeno de origem natural, a pentalenolactona (Figura 3.5), resulta em uma inibição tempo-dependente e irreversível através da modificação da Cisteína catalítica em cada uma das quatro subunidades da enzima. Esse antibiótico é altamente hidrofóbico e apresenta dois grupos reativos: um grupo epóxido e uma enona. A cinética de inativação exibiu um comportamento bifásico, com uma fase inicial rápida na qual a constante de afinidade (K_i) foi igual a 11,8 μM , e outra fase lenta com afinidade superior ($K_i = 6,12 \mu\text{M}$).^{21,22}

Além da pentalenolactona, outro antibiótico obtido de fungos, o ácido koníngín (Figura 3.5), se mostrou um inibidor irreversível potente da GAPDH. A partir dessa observação, Wilson *et al.* planejaram e desenvolveram duas séries de compostos análogos ao G3P carregando os grupos reativos epóxido e enona com o objetivo de encontrar inibidores irreversíveis da GAPDH de coelho e *T. brucei*.²³ Análises de inibição enzimática, RMN e titulação dos resíduos de Cisteína livres indicaram que os inibidores se ligam no sítio ativo das enzimas e formam uma ligação covalente com Cisteína. Além disso, uma comparação da reatividade desses inibidores mostrou que alguns deles exibem uma preferência pela enzima do parasito. Um dos inibidores testados apresentou uma elevada potência, com LD₁₀₀ igual a 0.6 μM contra a forma tripomastigota do *T. brucei*. Essa potência é bastante superior à de fármacos já utilizados no tratamento da doença do sono, como a pentamidina e (difluormetil)ornitina.

Em outro estudo, Ishii *et al.* verificaram que o composto 4-hidroxi-2-nonenal (HNE, mostrado na Figura 3.5), o maior produto da peroxidação de lipídeos, é um inibidor potente da enzima GAPDH de coelho.²⁴ Tem sido sugerido que o composto HNE exerce sua atividade inibitória na enzima devido à modificação da Cisteína catalítica através de uma adição de Michael. Para analisar o sítio de ligação do composto HNE, realizou-se a digestão da enzima com a enzima tripsina e a análise dos peptídeos resultantes por espectrometria de massas. Através dessa técnica eles verificaram a presença de cinco peptídeos, os quais contêm o composto HNE ligado na His164, Cys244, Cys281, His327 e Lys331. Entretanto, a modificação da Cisteína catalítica não foi observada, sugerindo que a inativação da enzima GAPDH pelo HNE ocorre apenas devido à modificação seletiva dos aminoácidos localizados na superfície da enzima.

Atualmente, estão reportadas na literatura apenas três classes de inibidores irreversíveis da TcGAPDH: haloacetamida (iodoacetamida), haloácido (ácido iodoacético) e *p*-nitrofenol éster-fosfonatos (Figura 3.5). Nas duas primeiras classes, os compostos apresentam um átomo de iodo, que é um bom grupo abandonador, ligado ao carbono alfa (C α) da carbonila. A estrutura cristalográfica desses inibidores complexados com a GAPDH foi obtida recentemente por Guido *et al.*^{25,26} Em uma delas o inibidor ácido iodo-acético se liga covalentemente à Cisteína catalítica da enzima (Cys166).²⁶ Além disso, este composto forma uma ligação de hidrogênio mediada por uma molécula de água com o NAD⁺.

Em outro trabalho, Castilho *et al.* sintetizaram três fosfonatos contendo um substituinte *p*-nitrofenol (Figura 3.5) que foram planejados para reagirem com a Cisteína catalítica e mimetizar o intermediário tio-hemiacetal formado durante catálise. Estes compostos inibiram a GAPDH de *T. cruzi* com mecanismo de tempo-dependente.⁹ A estrutura cristalográfica do complexo de um desses compostos foi obtida e verificou-se que o mesmo se liga covalentemente com a Cys166 em duas conformações alternadas, uma com o grupo fosfonato posicionado no sítio P_i e a outra com o mesmo grupo posicionado no sítio P_s. Esse trabalho contribuiu para validar a hipótese da existência do mecanismo *flip-flop* para a GAPDH.

3.1.4. Inibidores reversíveis

Uma análise da literatura mostrou os inibidores reversíveis da GAPDH de *T. cruzi* compreendem basicamente três fontes: análogos do substrato/produto, análogos do cofator NAD⁺ e produtos naturais. Esta última apresenta uma grande variedade de classes químicas que tem se mostrado inibidores da enzima. Vários compostos da classe dos flavonóides têm sido reportados como inibidores da GAPDH de *T. cruzi*.²⁷⁻²⁹ Em um trabalho recente, três flavonóides glicosilados se mostraram inibidores da enzima TcGAPDH.³⁰ O composto mais potente dessa série foi o Tirilosídeo, com um IC₅₀ igual a 46 μ M (Figura 3.6). No mesmo trabalho, três ácidos anacárdicos inibiram a enzima com IC₅₀ que variaram entre 38-161 μ M. A potência desses compostos aumenta com o número de ligações duplas na cadeia alquílica, de modo que o composto mais potente possui três ligações duplas.

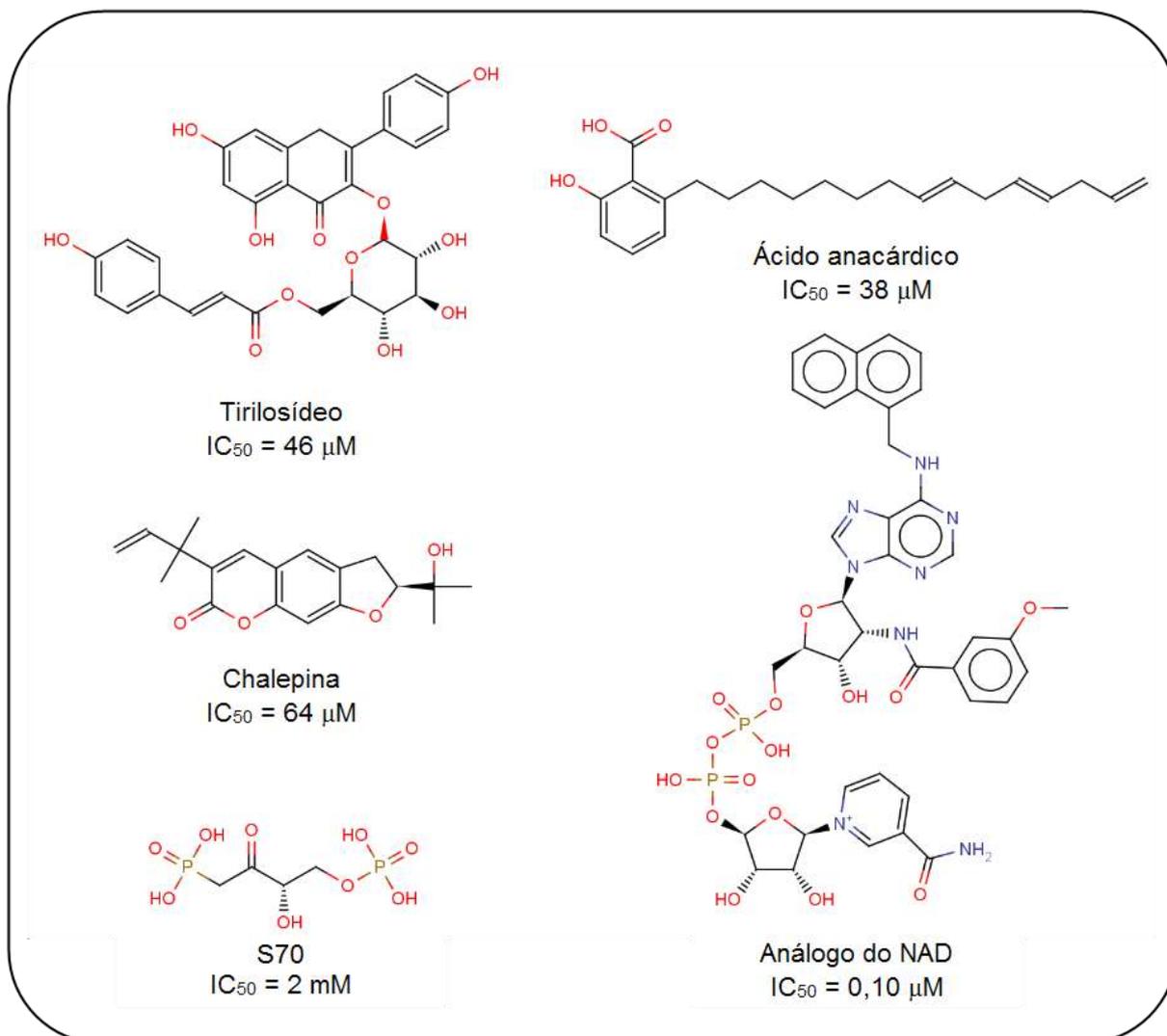


Figura 3.6 - Estruturas representativas das classes de inibidores reversíveis da GAPDH de *T. cruzi*

As Cumarinas também constituem uma classe de inibidores da GAPDH de *T. cruzi* bem frequente.^{31,32} Vieira *et al.* analisaram a atividade biológica de extratos da espécie *Rutales* contra a forma tripomastigota do *T. cruzi* e os que mostraram atividade significativa foram então fracionados para a determinação dos componentes. Em seguida 13 Cumarinas isoladas e estruturalmente caracterizadas foram testadas contra a enzima TcGAPDH.³¹ O composto mais potente encontrado foi a Chalepina (Figura 3.6) com valor de IC_{50} igual a $64 \mu M$, enquanto que o restante das Cumarinas apresentou valores de IC_{50} entre $93\text{-}617 \mu M$. A estrutura cristalina do co-complexo entre a Chalepina e a TcGAPDH revelou que esse composto de fato se liga ao sítio ativo da enzima e é estabilizado por uma interação hidrogênio com o resíduo Thr167 (mediada por uma molécula de água) e também por interações hidrofóbicas do seu grupo prenila com a Cisteína catalítica (Cys166).⁷

Ladame *et al.* avaliaram uma série de compostos análogos ao produto da reação (1,3-BPG) contra as GAPDHs de *T. cruzi* e *T. brucei*.⁸ Apesar da elevada similaridade desses compostos com o 1,3-BPG, todos se mostraram inibidores pouco potentes contra ambos os alvos, exibindo valores IC₅₀ na faixa de alto micromolar (500-2000 µM). A estrutura cristalográfica da TcGAPDH complexada com um desses compostos, o ácido 3-hidroxi-2-oxo-4-fosfonoxi-butil-fosfônico (S70, Figura 3.6), foi obtida. Nesta estrutura observou-se que o composto S70 se liga no sítio ativo da enzima, posicionando seu grupo fosfato no sítio P_s e o grupo fosfonato no sítio P_i. Apesar de se ligar ao sítio ativo da enzima, como mostrado no estudo de cristalização, o IC₅₀ desse composto é de apenas 2 mM.

De todos os compostos avaliados até hoje contra a GAPDH de tripanossomatídeos, sem dúvida os análogos de nucleotídeos estão entre os mais potentes. O grupo dos professores Christophe Verlinde e Michael Gelb planejou e sintetizou uma vasta coleção de compostos análogos do cofator NAD⁺ visando a identificação de novos inibidores da GAPDH de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. mexicana*.³³⁻³⁸ O planejamento desses inibidores se beneficiou da disponibilidade das estruturas cristalinas das GAPDHs dos três parasitos.

Com base nas regiões baixa similaridade estrutural entre as enzimas dos parasitos e enzima ortóloga humana, vários inibidores seletivos foram sintetizados. Desses inibidores, o mais potente contra a TcGAPDH é um composto análogo ao cofator NAD⁺ que apresenta IC₅₀ igual a 0,10 µM (Figura 3.6).³⁸ Além disso, esse inibidor foi inativo contra a enzima humana nas concentrações de 100 e 500 µM.

3.2. Enzima Diidroorotato desidrogenase

3.2.1. Reação e mecanismo

O segundo alvo escolhido para os estudos realizados nesse trabalho foi enzima TcDHODH (E.C. 1.3.3.1). Esta macromolécula é a quarta enzima atuante na biossíntese *de novo* de UMP, o precursor de todos os nucleotídeos de pirimidina, e catalisa a oxidação do (S)-Diidroorotato (DHO) a Orotato (ORO) com concomitante redução do Fumarato (FUM) a Succinato (SUC) segundo um mecanismo enzimático do tipo *ping-pong* (Figura 3.7).^{39,40}

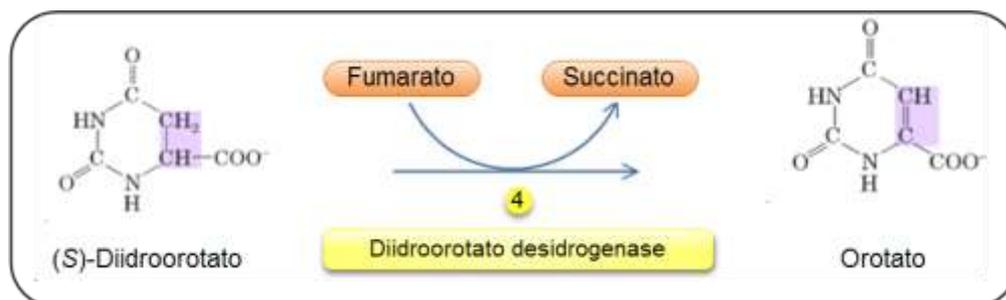


Figura 3.7 - Reação de óxido-redução catalisada pela enzima TcDHODH

Essa reação corresponde à única etapa de oxido-redução na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina. Durante a catálise, a DHODH utiliza a flavina mononucleotídeo (FMN) como coenzima na primeira parte da reação para promover a oxidação do substrato DHO enquanto a FMN é reduzida. Na segunda parte da reação, FMN é reoxidado através do auxílio de um segundo substrato, o agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas codificadas por genes diferentes da mesma família. No caso da enzima DHODH de Tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*, o Fumarato é o agente oxidante.^{40,41}

Nos últimos anos o mecanismo da reação catalisada pela DHODH tem sido bastante estudado, tanto com base em análises cinéticas quanto estruturais cristalográficas.^{42 - 52} Entretanto, o mecanismo detalhado de toda a reação da TcDHODH foi proposto apenas recentemente (Figura 3.8).⁵² Esta proposta foi feita com base em várias estruturas cristalográficas da enzima complexadas com substratos e produtos da reação.

A Cisteína 130 (Cys130) já foi identificada como a base responsável por abstrair um próton do carbono-5 (C₅) do DHO. De acordo com Inaoka *et al.*, durante a oxidação do DHO, que consiste da primeira metade da reação, o próton abstraído do carbono C₅ pela Cys130 (H_{5a}, na Figura 3.8) é liberado para uma molécula de água estrutural que o transfere para o solvente externo através de uma rede de ligações de hidrogênio. Juntamente com a abstração do próton H_{5a} do carbono C₅, o DHO transfere um hidrogênio (H₆) na forma de hidreto ao nitrogênio N₅ do cofator FMN. Este processo de redução ocorre enquanto a carga negativa do FMN aniônico reduzido (FMNH⁻) é estabilizada pelos resíduos Lys43 e Lys164.⁴³ Em seguida o produto da primeira metade da reação (ORO) deixa o sítio ativo para a entrada do agente oxidante (FUM).

Na segunda metade da reação, a redução do Fumarato (FUM) a Succinato (SUC), uma torção na ligação entre os carbonos C_2 e C_3 do FUM quebra a uniformidade de distribuição dos elétrons- π de sua ligação dupla conjugada, induzindo uma separação de cargas, representadas na Figura 3.8 como $C_2^{\delta-}$ e $C_3^{\delta+}$. Esta separação de cargas parciais atua como um guia para a transferência de um hidreto ao carbono $C_3^{\delta+}$ do FUM pelo nitrogênio N_5 do FMNH⁻, e de um próton da Cys130 ao carbono $C_2^{\delta-}$. Neste caso, o próton provém da molécula de água K que, através da rede de interações, pode cedê-lo à Cy130 a qual em seguida o transfere para FUM.⁴³ Ao final desta etapa o sítio fica novamente disponível para a entrada de outra molécula de substrato (ORO) e um novo ciclo da catálise.

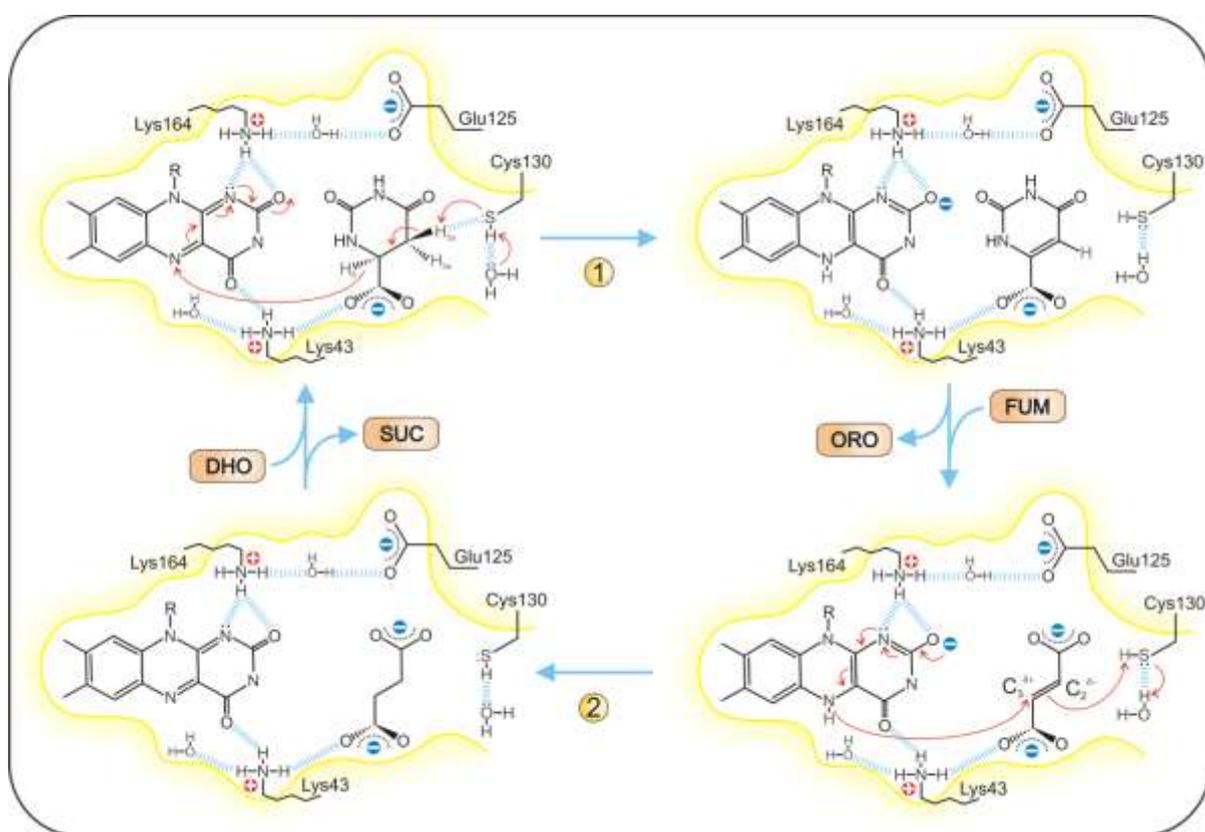


Figura 3.8 - Mecanismo da reação catalisada pela enzima TcDHODH: (1) O DHO é convertido a ORO através da abstração do próton H_{5a} pela Cys130 e transferência do hidreto H_6 ao nitrogênio N_5 do FMN e (2) na segunda metade da reação a transferência de um hidreto (H) pelo FMN aniônico e a de um próton pela Cys130 ao agente oxidante (FUM) é facilitada pela separação de cargas parciais induzida entre os carbonos C_2 e C_3 do mesmo devido a quebra na uniformidade de distribuição dos elétrons- π provocada por uma torção na ligação entre estes dois átomos, esta por sua vez é estabilizada pela interação do oxigênio carboxílico com a Lys43

3.2.2. Estrutura

De acordo com a estrutura primária e localização celular, as enzimas DHODH de diferentes organismos podem ser divididas nas Famílias 1 e 2.⁵³ As enzimas da Família 1 podem ser subdivididas nas classes 1A, 1B e em uma nova classe (1S) encontrada recentemente.⁵⁴ A bactéria *Lactococcus lactis*, por exemplo, contém genes que codificam DHODHS as classes 1A e 1B de DHODHs.⁵⁵

Enquanto as membros das classes 1A e 1B são citosólicas, as DHODHs da Família 2 apresentam uma extensão na região N-terminal que permite a associação dessas enzimas com membranas.⁵⁶ Esta diferença se caracteriza também pela identidade sequencial entre as enzimas é geralmente menor que 20%.⁴⁸

Outra diferença entre as duas famílias de enzimas diz respeito ao aceitador natural de elétrons utilizado na reoxidação do cofator (FMN). As enzimas da Família 1, como por exemplo as de Tripanosomatídeos, utilizam como aceptores de elétrons moléculas de oxigênio solúveis em água, como o FUM e o NAD⁺. Já as enzimas da Família 2 utilizam moléculas de caráter hidrofóbico, porém solúveis em água. No caso da enzima humana, pertencente à Família 2, a Ubiquinona é o agente oxidante. Em geral, todas as famílias de DHODHs são capazes de utilizar uma variedade de compostos como aceptores de elétrons, tais como corantes ou quinonas solúveis em água (e.g. DCIP).^{43,57}

As DHODHs da classe 1A são proteínas homodiméricas que utilizam o Fumarato como receptor de elétrons, como é o caso da TcDHODH,⁴⁸ enquanto que as pertencentes à classe 1B são enzimas heterotetraméricas e fazem uso de um centro redox constituído de um agregado contendo NAD⁺, Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um complexo de Fe₂S₂, como agente oxidante.^{48,55}

Além dessas diferenças, o resíduo responsável pela abstração do próton do DHO na primeira metade da catálise também difere entre as enzimas DHODHs de diferentes classes. Nas DHODHs da Família 1, uma Cisteína funciona como base catalítica, enquanto que nas da Família 2 este resíduo é substituído por uma Serina.⁴⁴ Na TcDHODH, o átomo de enxofre S_γ da Cisteína catalítica (Cys130) está localizado a uma distância de 3,52 Å do C₅ do ORO no momento da catálise.⁵²

Uma característica importante das DHODHs da classe 1A é o fato de o sítio catalítico estar enterrado dentro de cada unidade monomérica e encoberto por uma alça bastante flexível composta pelos resíduos 128-135, chamada de *alça ativa* ou 90

loop $\beta 4-\alpha A$, que abre e fecha para permitir a entrada dos substratos e saída dos produtos do sítio. Enterrado e preso a esta cavidade, encontra-se o cofator FMN (ou grupo prostético, para uma definição mais rígida), o qual possui graus de liberdade conformacionais bastante restritos devido a interações bastante específicas com o sítio.⁴⁸⁻⁵¹

A forma planar do anel de oxazolidina do cofator permite o posicionamento paralelo do anel pirimidínico do DHO e do ORO, sem alterar significativamente a conformação da cadeia polipeptídica que circunda a região do sítio.^{50,52} Na Figura 3.9 é mostrada uma representação desse emparelhamento dos compostos dentro do sítio. Nesta, é possível observar que a Cys130 também se posiciona paralelamente ao substrato. Esta espécie de “sanduíche” molecular favorece a retirada dos hidrogênios dos carbonos C₅ e C₆ do substrato e transferência aos carbonos C₂ e C₃ do FUM (vide Figura 3.8).^{50,52}

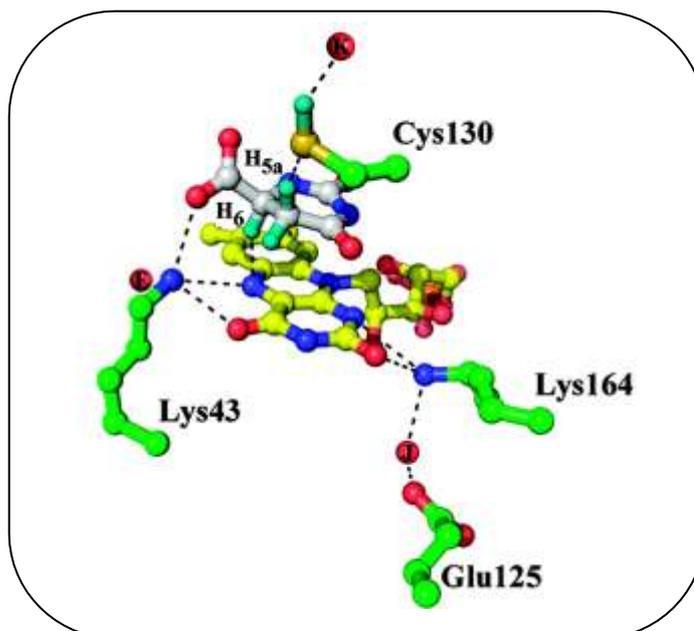


Figura 3.9 - Posicionamento do DHO e do FMN dentro do sítio ativo da TcDHODH

Várias as estruturas cristalográficas de DHODHs pertencentes a diferentes organismos têm sido determinados através de cristalografia de raios-X^{50,52,56,58 - 63} Na tabela Tabela 3.1 é apresentado um resumo de todos os organismos para os quais estão disponíveis as estruturas cristalográficas das enzimas DHODHs no Banco de dados de Proteínas (PDB),⁶⁴ juntamente com algumas informações relevantes sobre suas características estruturais.

Tabela 3.1 - Resumo das características estruturais de diferentes classes de DHODHs disponíveis no PDB

Classe	Organismo	Cofator	Agente oxidante	PDB	Estrutura
1A	<i>Trypanosoma cruzi</i>	FMN	Fumarato	2E6F*	Homodímero
	<i>Leishmania donovani</i>			3C61*	
	<i>Lactococcus lactis</i>			1JUE*	
	<i>Trypanosoma brucei</i>			2B4G	
1B	<i>Lactococcus lactis</i>	FAD,FMN e Fe ₂ S ₂	NAD ⁺	1EP3*	Homotetrâmero
2	<i>Homo sapiens</i>	FMN	Ubiquinona	2FPV*	monômero
	<i>Plasmodium falsiparum</i>			3FJ6*	
	<i>Rattus</i>			1UUM*	

* mais de uma estrutura disponível

Em geral, as enzimas de ambas as Famílias apresentam uma estrutura terciária similar, enovelando-se em um motivo barril α/β que consiste de uma região central formada por 8 fitas beta paralelas rodeadas por 8 α -hélices (Figura 3.10). No topo do barril, três fitas β antiparalelas formam uma espécie de “tampa” que cobre o sítio redox. O fundo do barril é formado um par de fitas β antiparalelas. As enzimas pertencentes à classe 2 das DHODHs, como por exemplo HsDHODH (Figura 3.10 (b)), contêm na região N-terminal um motivo adicional composto de três hélices, responsável pela interação da enzima com a membrana, e que se encontra ausente na estrutura de DHODHs da Família 1. Além disso, DHODHs da Família 2 apresentam um longa alça que conecta uma das α -hélices do N-terminal ao fundo do barril.

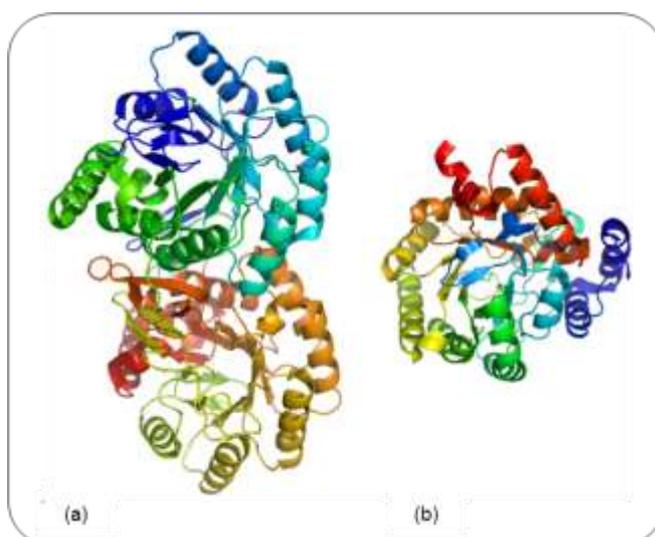


Figura 3.10 - Estruturas tridimensionais de DHODHs pertencentes às classes 1 e 2. (a) LIDHODHA e (b) HsDHODH. Ambas as proteínas enovelam-se um motivo do tipo barril α/β . A TcDHODH é dimérica enquanto HsDHODH é monomérica

3.2.3. Inibidores

Estudos utilizando experimentos de “*knock out*” do gene que codifica a enzima Diidroorotato desidrogenase de TcDHODH⁶⁵ sugerem o papel essencial desta enzima para a sobrevivência do parasito e, mesmo com a ampla diversidade de estudos sobre as propriedades estruturais e funcionais desta enzima e outras pertencentes à Família 1, não há relatos na literatura sobre planejamento ou teste de inibidores da TcDHODH com o objetivo de desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Chagas.

Vários inibidores focando o sítio de interação da Ubiquinona têm sido planejados para enzimas DHODHs de humanos. Por exemplo, a Leflunomida (ARAVA®, Sanofi-Aventis; Figura 3.11 (a)), que já está disponível para uso clínico para o tratamento de artrite reumatóide.⁵⁶ Outros inibidores potentes de DHODHs de organismos tais como *Escherichia coli*,⁶⁶ *Helicobacter pylori*⁶⁷ e *Plasmodium Falsíparum*⁶⁸ planejados para a Família 2 de DHODHs. Por outro lado apenas dois inibidores de DHODHs da Família 1 são conhecidos, os compostos 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato (Figura 3.11 (b)). Estes compostos foram identificados por Palfey *et al* e recentemente estudados como inibidores da DHODH de *Lactococcus lactis* através de métodos calorimétricos e espectroscópicos para avaliar o efeito do pH nas suas afinidades pelo alvo.^{69,70}

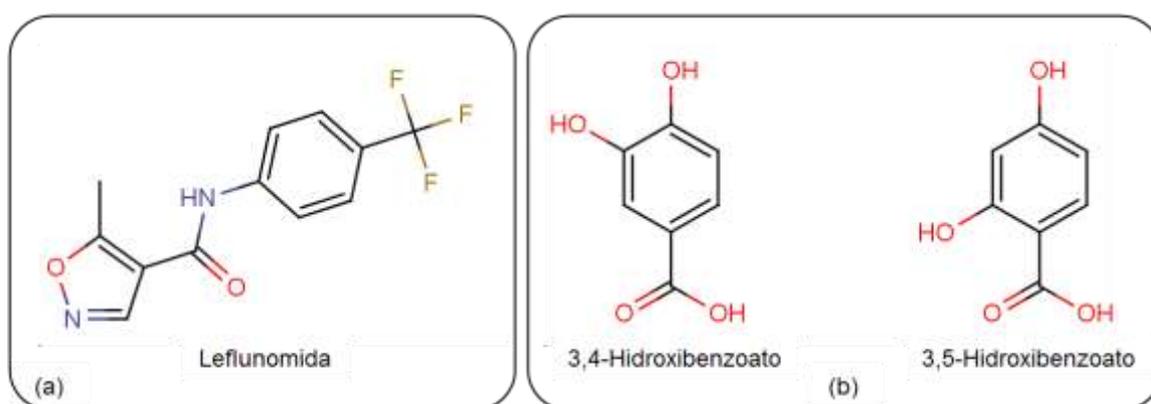


Figura 3.11 - Estruturas da (a) Leflunomida, fármaco que tem como alvo a HsDHODH e (b) dos compostos 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato, os únicos inibidores conhecidos da Família 1 de DHODHs

Outros ligantes conhecidos são os inibidores naturais da DHODHs da Família 1, como o próprios produtos de reação (ORO) e o (SUC). Além desses, a enzima também é capaz de converter o composto Diidrooxonato (DOX) a Oxonato (OXO). Deste modo, este o OXO também é capaz de atuar como Inibidor.⁷¹

3.3. Conclusões

O entendimento dos mecanismos das reações catalisadas pelos alvos e das características estruturais envolvidas nestes processos é de suma importância para o planejamento de compostos capazes de modular suas atividades. O mapeamento adequado dos resíduos essenciais para o reconhecimento molecular dos alvos macromoleculares torna o processo de identificação, seleção e otimização de inibidores mais racionalmente dirigidos, que é o princípio base da Química Medicinal moderna.

Através da relação sinérgica entre a descoberta de inibidores e o entendimento do papel bioquímico de alvos de interesse terapêutico é possível validar e verificar sua tratabilidade do ponto de vista químico e biológico. Em outras palavras, tentar encontrar respostas para duas das questões mais importantes dentro do desenvolvimento de novos fármacos: A modulação do alvo tem como resposta o efeito farmacológico desejado? É possível planejar compostos com perfis estruturais e farmacocinéticos compatíveis de tal maneira que estes alcancem o alvo dentro do organismo e sejam capazes de interagir de modo complementar e seletivo com os mesmos? Neste sentido, diversos estudos têm contribuído para a investigação e elucidação do papel das enzimas GAPDH e DHODH para a sobrevivência não só do *T. cruzi*, mas também de outros parasitos nocivos ao organismo humano.

No que diz respeito à descoberta de inibidores, pode-se dizer que os estudos envolvendo a TcGAPDH estão um passo a frente dos da TcDHODH, com diversas classes identificadas que, apesar de não terem evoluído a compostos-líderes, por razões nem sempre óbvias, têm contribuído como ferramentas para a descoberta de novos inibidores que poderão vir a se tornar casos de sucesso no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença de Chagas.

3.4. Referências

1. GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Glycolysis. In: GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. (Eds.). **Biochemistry**. London: Hardcover, 1999. p. 609-638.
2. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.). **Lehninger: principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2005. p. 521-559.

3. KIM, H.; FEIL, I. K.; VERLINDE, C. L.; PETRA, P. H.; HOL, W. G. Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site. **Biochemistry**, v. 34, n. 46, p. 14975-14986, 1995.
4. ARONOV, A. M.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; VERLINDE, C. L. M. J.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4273-4278, April 13, 1999 .
5. SURESH, S.; BRESSI, J. C.; KENNEDY, K. J.; VERLINDE, C. L. M. J.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 2, p. 423-435, 2001.
6. KIM, H.; HOL, W. G. J. Crystal structure of *Leishmania mexicana* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a new crystal form confirms the putative physiological active site structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, n. 1, p. 5-11, 1998.
7. PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L. A.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. F. G. F.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P. C.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, n. 1-3, p. 13-17, 2002.
8. LADAME, S.; CASTILHO, M. S.; SILVA, C. H. T. P.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; PÉRIÉ, J.; OLIVA, G.; WILLSON, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 22, p. 4574-4586, 2003.
9. CASTILHO, M. S.; PAVAO, F.; OLIVA, G.; LADAME, S.; WILLSON, M.; PERIE, J. Evidence for the two phosphate binding sites of an analogue of the thioacyl intermediate for the *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed reaction, from its crystal structure. **Biochemistry**, v. 42, n. 23, p. 7143-7151, 2003.
10. VELLIEUX, F. M.; HAJDU, J.; VERLINDE, C. L.; GROENDIJK, H.; READ, R. J.; GREENHOUGH, T. J.; CAMPBELL, J. W.; KALK, K. H.; LITTLECHILD, J. A.; WATSON, H. C. Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from laue data. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 6, p. 2355-2359, 1993.
11. JENKINS, J. L.; TANNER, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D**, v. 62, n. 3, p. 290-301, 2006.
12. SATCHELL, J. F.; MALBY, R. L.; LUO, C. S.; ADISA, A.; ALPYUREK, A. E.; KLONIS, N.; SMITH, B. J.; TILLEY, L.; COLMAN, P. M. Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. **Acta Crystallographica Section D**, v. 61, n. 9, p. 1213-1221, 2005.
13. ROBIEN, M. A.; BOSCH, J.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; WORTHEY, E. A.; MYLER, P.; MEHLIN, C.; BONI, E. E.; KALYUZHNIY, O.; ANDERSON, L.; LAURICELLA, A.; GULDE, S.; LUFT, J. R.; DETITTA, G.; CARUTHERS, J. M.; HODGSON, K. O.; SOLTIS, M.; ZUCKER, F.; VERLINDE, C. L.; MERRITT, E. A.; SCHOENFELD, L. W.; HOL, W. G. Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* at 2.25 Å resolution reveals intriguing extra electron density in the active site. **Proteins**, v. 62, n. 3, p. 570-577, 2006.
14. SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.

15. PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
16. DIDIERJEAN, C.; CORBIER, C.; FATIH, M.; FAVIER, F.; BOSCHI-MULLER, S.; BRANLANT, G.; AUBRY, A. Crystal structure of two ternary complexes of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* with NAD and D-glyceraldehyde 3-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 15, p. 12968-12976, 2003.
17. YUN, M.; PARK, C. G.; KIM, J. Y.; PARK, H. W. Structural analysis of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*: direct evidence of substrate binding and cofactor-induced conformational changes. *Biochemistry*, v. 39, n. 35, p. 10702-10710, 2000.
18. SKARZNSKI, T.; MOODY, P. C. E.; WONACOTT, A. J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 193, n. 1, p. 171-187, 1987.
19. COOK, W.; SENKOVICH, O.; CHATTOPADHYAY, D. An unexpected phosphate binding site in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: Crystal structures of apo, holo and ternary complex of *Cryptosporidium parvum* enzyme. *BMC Structural Biology*, v. 9, n. 1, p. 9, 2009.
20. LI, Y. K.; BOGGARAM, J.; BYERS, L. D. Alkylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with haloacetylphosphonates. *Biochemical Journal*, v. 275, n. 3, p. 767-773, 1991.
21. CANE, D. E.; SOHNG, J. K. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone 2: identification of the site of alkylation by tetrahydropentalenolactone. *Biochemistry*, v. 33, n. 21, p. 6524-6530, 1994.
22. CANE, D. E.; SOHNG, J.-K. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone: kinetic and mechanistic studies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 270, n. 1, p. 50-61, 1989.
23. WILSON, M.; LAUTH, N.; PERIE, J. Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by phosphorylated epoxides and α -enones. *Biochemistry*, v. 33, n. 1, p. 214-220, 1994.
24. ISHII, T.; TATSUDA, E.; KUMAZAWA, S.; NAKAYAMA, T.; UCHIDA, K. molecular basis of enzyme inactivation by an endogenous electrophile 4-hydroxy-2-nonenal: identification of modification sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, v. 42, n. 12, p. 3474-3480, 2003.
25. GUIDO, R. V. C.; BALLIANO, T. L.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Kinetic and crystallographic studies on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* in complex with iodoacetate. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 6, n. 3, p. 210-214, 2009.
26. GUIDO, R. V. C.; BALLIANO, T. L.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Structural insights underlying glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase iodoacetate irreversible inhibitor: crystallography, kinetics studies and molecular mechanism. *The FEBS Journal*, v. 275, n. 1, p. 173-173, 2008.
27. JANUÁRIO, A. H.; LOURENCO, M. V.; DOMEZIO, L. A.; PIETRO, R. C. L. R.; CASTILHO, M. S.; TOMAZELA, D. M.; FERNANDES DA SILVA, M. F. D. G.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; FRANCA, S. D. C. Isolation and structure determination of bioactive isoflavones from callus culture of *Dipteryx odorata*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n. 7, p. 740-742, 2005.

28. MORAES, V. R. S.; TOMAZELA, D. M.; FERRACIN, R. J.; GARCIA, C. F.; SANNOMYA, M.; SORIANO, M. P. C.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; FILHO, E. R.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; PIMENTA, E. F.; SOUZA, D. H. F.; OLIVA, G. Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of polymethoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in *Neoraputia* (Rutaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 380-387, 2003.
29. TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A. P.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FO, E.; OLIVA, G.; PIRANI, J. R. Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 643-651, 2000.
30. FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I. C.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; TREVISAN, M. T. S.; VILEGAS, W.; SILVA, M. G. V.; MONTANARI, C. A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2476-2482, 2009.
31. VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 617-622, 2001.
32. MARCHI, A. A.; CASTILHO, M. S.; NASCIMENTO, P. G. B.; ARCHANJO, F. C.; DEL PONTE, G.; OLIVA, G.; PUPO, M. T. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4823-4833, 2004.
33. VAN CALENBERGH, S.; VERLINDE, C. L. M. J.; SOENENS, J.; DE BRUYN, A.; CALLENS, M.; BLATON, N. M.; PEETERS, O. M.; ROZENSKI, J.; HOL, W. G. J.; HERDEWIJN, P. Synthesis and structure-activity relationships of analogs of 2'-deoxy-2'-3(- methoxybenzamido)adenosine, a selective inhibitor of trypanosoma1 glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 19, p. 3838-3849, 1995.
34. ARONOV, A. M.; GELB, M. H. Synthesis and structure-activity relationships of adenosine analogs as inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Modifications at positions 5' And 8. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 24, p. 3505-3510, 1998.
35. ARONOV, A. M.; VERLINDE, C. L. M. J.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 4790-4799, 1998.
36. ARONOV, A. M.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; VERLINDE, C. L. M. J.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4273-4278.
37. BRESSI, J. C.; VERLINDE, C. L. M. J.; ARONOV, A. M.; SHAW, M. L.; SHIN, S. S.; NGUYEN, L. N.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; KUNTZ, I. D.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of trypanosomatidae via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2080-2093, 2001.
38. KENNEDY, K. J.; BRESSI, J. C.; GELB, M. H. A disubstituted NAD⁺ analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 95-98, 2001.

39. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.). *Lehninger: principles of biochemistry*. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p. 862-880.
40. FELICIANO, P. R.; CORDEIRO, A. T.; COSTA-FILHO, A. J.; NONATO, M. C. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. *Protein Expression and Purification*, v. 48, n. 1, p. 98-103, 2006.
41. TAKASHIMA, E.; INAOKA, D. K.; OSANAI, A.; NARA, T.; ODAKA, M.; AOKI, T.; INAKA, K.; HARADA, S.; KITA, K. Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 122, n. 2, p. 189-200, 2002.
42. CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. *Analytical Biochemistry*, v. no prelo, 2010.
43. BJÖRNBERG, O.; JORDAN, D. B.; PALFEY, B. A.; JENSEN, K. F. Dihydrooxonate Is a Substrate of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHOD) Providing evidence for involvement of cysteine and serine residues in base catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 391, n. 2, p. 286-294, 2001.
44. FAGAN, R. L.; JENSEN, K. F.; BJÖRNBERG, O.; PALFEY, B. A. Mechanism of flavin reduction in the class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. *Biochemistry*, v. 46, n. 13, p. 4028-4036, 2007.
45. FAGAN, R. L.; NELSON, M. N.; PAGANO, P. M.; PALFEY, B. A. Mechanism of Flavin Reduction in Class 2 Dihydroorotate Dehydrogenases. *Biochemistry*, v. 45, n. 50, p. 14926-14932, 2006.
46. JORDAN, D. B.; BISAHA, J. J.; PICOLLELLI, M. A. Catalytic Properties of Dihydroorotate Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: Studies on pH, Alternate Substrates, and Inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 378, n. 1, p. 84-92, 2000.
47. MARCINKEVICIENE, J.; JIANG, W.; LOCKE, G.; KOPCHO, L. M.; ROGERS, M. J.; COPELAND, R. A. A second dihydroorotate dehydrogenase (Type A) of the human pathogen enterococcus faecalis: expression, purification, and steady-state kinetic mechanism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 377, n. 1, p. 178-186, 2000.
48. ROWLAND, P.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*. *Structure*, v. 5, n. 2, p. 239-252, 1997.
49. ROWLAND, P.; NØRAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. 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, 2000.
50. NORAGER, S.; ARENT, S.; BJÖRNBERG, O.; OTTOSEN, M.; LEGGIO, L. L.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 31, p. 28812-28822, 2003.
51. ROWLAND, P.; LARSEN, S.; BJÖRNBERG, O.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. *Protein Science*, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.

52. INAOKA, D. K.; SAKAMOTO, K.; SHIMIZU, H.; SHIBA, T.; KURISU, G.; NARA, T.; AOKI, T.; KITA, K.; HARADA, S. 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. 10881-10891, 2008
53. BJORNBERG, O.; ROWLAND, P.; LARSEN, S.; JENSEN, K. F. Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from Lactococcus lactis investigated by chemical modification and mutagenesis. *Biochemistry*, v. 36, n. 51, p. 16197-16205, 1997.
54. SØRENSEN, P.; DANDANELL, G. A new type of dihydroorotate dehydrogenase, type 1S, from the thermoacidophilic archaeon Sulfolobus solfataricus. *Extremophiles*, v. 6, n. 3, p. 245-251, 2002.
55. 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, 1996.
56. LIU, S.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antipliferative agents. *Structure with Folding & Design*, v. 8, p. 25-33, 2000.
57. BJORNBERG, O.; GRUNER, A.-C.; ROEPSTORFF, P.; JENSEN, K. F. The Activity of Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase is dependent on a conserved loop identified by sequence homology, mutagenesis, and limited proteolysis. *Biochemistry*, v. 38, n. 10, p. 2899-2908, 1999.
58. ROWLAND, P.; NORAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. Crystallization and preliminary X-ray studies of membrane-associated Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section D*, v. 56, n. 5, p. 659-661, 2000.
59. ROWLAND, P.; NORAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. *Crystal structure of lactococcus lactis dihydroorotate B*. Disponível em: <<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EP1>> Acesso em: 09 jan. 2010.
60. ARAKAKI, T. L.; BUCKNER, F. S.; GILLESPIE, J. R.; MALMQUIST, N. A.; PHILLIPS, M. A.; KALYUZHNIY, O.; LUFT, J. R.; DETITTA, G. T.; VERLINDE, C. L. M. J.; VOORHIS, W. C. V.; HOL, W. G. J.; MERRITT, E. A. 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, p. 37-50, 2008.
61. HANSEN, M.; NOURS, J. L.; JOHANSSON, E.; ANTAL, T.; ULLRICH, A.; LÖFFLER, M.; LARSEN, S. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. *Protein Science*, v. 13, n. 4, p. 1031-1042, 2004.
62. DAVIES, M.; HEIKKILÄ, T.; MCCONKEY, G. A.; FISHWICK, C. W. G.; PARSONS, M. R.; JOHNSON, A. P. Structure-based design, synthesis, and characterization of inhibitors of human and Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenases. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 52, n. 9, p. 2683-2693, 2009.
63. ARAKAKI, T. L., MERRITT, E. A.; ULLMAN, B.; YATES, P. *Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania donovani A*. Disponível em: <<http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3C61>> Acesso em: 09 jan. 2010.
64. BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

65. ANNOURA, T.; NARA, T.; MAKIUCHI, T.; HASHIMOTO, T.; AOKI, T. 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, 2005.
66. MARCINKEVICIENE, J.; ROGERS, M. J.; KOPCHO, L.; JIANG, W.; WANG, K.; MURPHY, D. J.; LIPPY, J.; LINK, S.; CHUNG, T. D. Y.; HOBBS, F.; HAQUE, T.; TRAINOR, G. L.; SLEE, A.; STERN, A. M.; COPELAND, R. A. Selective inhibition of bacterial dihydroorotate dehydrogenases by thiadiazolidinediones. *Biochemical Pharmacology*, v. 60, n. 3, p. 339-342, 2000.
67. COPELAND, R. A.; MARCINKEVICIENE, J.; HAQUE, T. S.; KOPCHO, L. M.; JIANG, W.; WANG, K.; ECRET, L. D.; SIZEMORE, C.; AMSLER, K. A.; FOSTER, L.; TADESSE, S.; COMBS, A. P.; STERN, A. M.; TRAINOR, G. L.; SLEE, A.; ROGERS, M. J.; HOBBS, F. Helicobacter pylori-selective antibacterials based on inhibition of pyrimidine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 43, p. 33373-33378, 2000.
68. BALDWIN, J.; MICHNOFF, C. H.; MALMQUIST, N. A.; WHITE, J.; ROTH, M. G.; RATHOD, P. K.; PHILLIPS, M. A. High-throughput screening for potent and selective inhibitors of plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 23, p. 21847-21853, 2005.
69. PALFEY, B. A.; BJORNBERG, O.; JENSEN, K. F. Specific inhibition of a family 1A dihydroorotate dehydrogenase by benzoate pyrimidine analogues. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 18, p. 2861-2864, 2001.
70. WOLFE, A. E.; THYMARK, M.; GATTIS, S. G.; FAGAN, R. L.; HU, Y.-C.; JOHANSSON, E.; ARENT, S.; LARSEN, S.; PALFEY, B. A. Interaction of benzoate pyrimidine analogues with class 1A dihydroorotate dehydrogenase from Lactococcus lactis. *Biochemistry*, v. 46, n. 19, p. 5741-5753, 2007.
- 71 . BJÖRNBERG, O.; JORDAN, D. B.; PALFEY, B. A.; JENSEN, K. F. Dihydrooxonate is a substrate of dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) providing evidence for involvement of cysteine and serine residues in base catalysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 391, n. 2, p. 286-294, 2001.

Capítulo 4



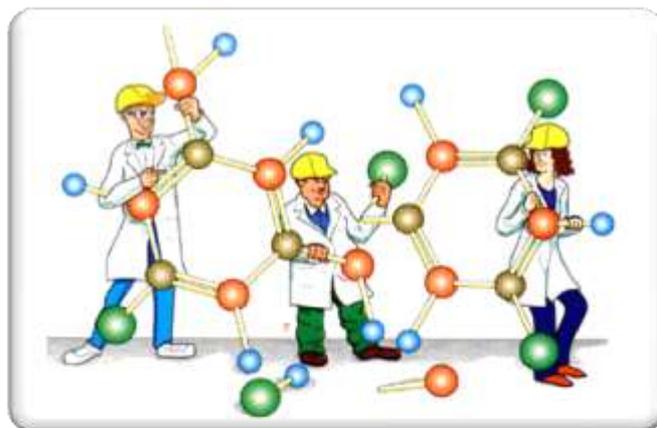
Objetivos

Neste capítulo são apresentados os objetivos do presente trabalho.

Os objetivos deste trabalho são:

- ✓ A utilização e aplicação dos métodos de Quiminformática em ensaios virtuais baseados nas estruturas dos ligantes (LBVS) e do receptor (SBVS) para a seleção de moléculas capazes de inibir as enzimas Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase e Diidroorotato desidrogenase do parasito *Trypanosoma cruzi*;
- ✓ O Estabelecimento de estratégias para a seleção de moléculas com perfis estruturais e propriedades físico-químicas que as caracterizem como compostos-líderes passíveis de otimização molecular dentro do contexto da Química Medicinal moderna para o planejamento de fármacos;
- ✓ A validação dos métodos e das estratégias adotadas para seleção das moléculas, através da aquisição e teste biológico *in vitro* contra as enzimas TcGAPDH e TcGAPDH. (Os ensaios bioquímicos contra a enzima TcDHODH foram realizados pela aluna do NEQUIMED Juliana Cheleski como parte do seu projeto de doutorado);
- ✓ O planejamento e aquisição de uma série de compostos para nova avaliação *in vitro* e a realização de análise das relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos testados para racionalização das propriedades moleculares importantes para a modulação dos alvos escolhidos.

Capítulo 5



Planejamento de inibidores da enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Neste capítulo são apresentados os métodos e estratégias usados para a seleção e identificação de inibidores da enzima TcGAPDH bem como os resultados obtidos e as discussões sobre os mesmos.

5.1. Materiais e métodos

Os ensaios virtuais e os estudos de modelagem molecular foram realizados no Laboratório de Quiminformática e Modelagem Molecular do Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais – NEQUIMED-PN, do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Os trabalhos foram desenvolvidos em estações Linux Fedora 10 utilizando-se os bancos de dados e softwares listados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Relação de softwares/banco de dados e suas aplicações dentro do processo de seleção de inibidores da enzima TcGAPDH

Software/banco de dados	Aplicação
PDB ¹	Obtenção das estruturas tridimensionais da enzima GAPDH
ZINC database ²	Banco de dados inicial contendo estruturas moleculares de compostos comercialmente disponíveis
Filter ³	Filtragem dos compostos advindos do banco de dados ZINC, para a remoção de compostos contendo propriedades e características estruturais indesejáveis na série a ser avaliada contra a enzima GAPDH
Maestro ⁴	Análise gráfica e preparação das estruturas 3D do alvo
Omega ⁵	Preparo do banco de dados multiconformacional contendo os compostos da subcoleção obtida após a filtragem que foi utilizada como input para o programa de docagem molecular Fred
Fred ⁶	Docagem molecular do banco de dados multiconformacional preparados com o programa Omega
FlexX (Sybyl 8.0) ⁷	Docagem molecular da subcoleção de compostos obtida após a filtragem, para análise consensual das energias
Origin ⁸	Análise consensual dos valores das energias de docagem obtidas para os compostos da subcoleção através dos programas Fred e FlexX
Autodock ^{9,10}	Docagem dos compostos mais bem pontuados de acordo com a análise consensual das pontuações
Autodocktools ¹¹	Análise gráfica dos resultados da docagem feita pelo programa Autodock
Emolecules ¹²	Recuperação dos dados sobre a disponibilidade comercial dos compostos

A estratégia para a aplicação dos ensaios virtuais utilizada no planejamento de inibidores da enzima TcGAPDH consistiu do emprego de vários filtros consecutivos e em ordem crescente de complexidade dos métodos. Um esquema ilustrativo da estratégia adotada é mostrado na Figura 5.1.

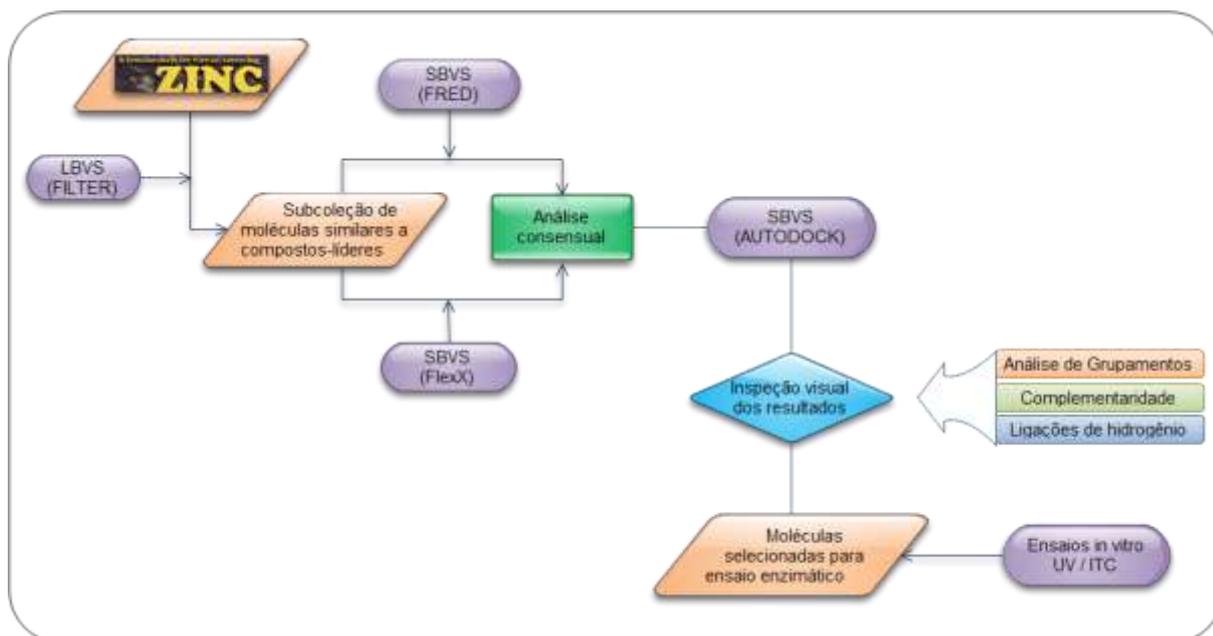


Figura 5.1 - Esquema estratégico adotado para o planejamento de novos inibidores da enzima GAPDH

Inicialmente, foi feita uma busca por estruturas cristalográficas das enzimas TcGAPDH e HsGAPDH no banco de dados PDB para a análise dos parâmetros estruturais, definição da região a ser explorada na busca por ligantes e a comparação entre os sítios ativos para verificar as possibilidades de obter alguma seletividade entre as mesmas imprimindo-se determinadas características nos compostos a serem testados.

Em seguida realizou-se a aquisição de uma coleção virtual contendo aproximadamente 2,5 milhões de compostos comercialmente disponíveis do banco de dados de domínio público ZINC. A esta coleção foram aplicados uma série de filtros moleculares utilizando-se o programa Filter. Para isso, foram utilizados os parâmetros apropriados para a seleção de estruturas similares a compostos-líderes (*lead-like filter*) disponíveis no manual do usuário do programa. A Tabela 5.2 traz um resumo dos parâmetros mais importantes para a definição de uma região do espaço químico composta por substâncias químicas similares a compostos-líderes. A lista completa dos parâmetros utilizados pode ser encontrada no Apêndice A.

A subcoleção obtida após a filtragem do banco de dados inicial, juntamente com a estrutura tridimensional da enzima foram utilizadas como input para a aplicação dos SBVSs. Para este estudo, inicialmente foram empregados os

programas Fred e FlexX com base nas coordenadas cartesianas da estrutura da TcGAPDH depositada no PDB pelo código 1QXS.

Tabela 5.2 - Alguns dos parâmetros mais importantes escolhidos para filtragem da coleção inicial de compostos utilizando o programa Filter

Parâmetro	Valor	Definição
MIN_MOLWT	150 g mol ⁻¹	Peso molecular mínimo
MAX_MOLWT	440 g mol ⁻¹	Peso molecular máximo
MIN_ROT_BONDS	0	Número mínimo de graus de liberdade conformacionais
MAX_ROT_BONDS	10	Número máximo de graus de liberdade conformacionais
MIN_LIPINSKI_DONORS	0	Número mínimo de hidrogênios ligados a O e N
MAX_LIPINSKI_DONORS	5	Número máximo de hidrogênios ligados a O e N
MIN_LIPINSKI_ACCEPTORS	0	Número mínimo de átomos de O e N
MAX_LIPINSKI_ACCEPTORS	10	Número máximo de átomos de O e N
MIN_XLOG P	-5	Logaritmo do coef. de partição octanol/água mínimo
MAX_XLOG P	5	Logaritmo do coef. de partição octanol/água máximo
MIN_2D_PSA	0	Área superficial polar bidimensional mínima
MAX_2D_PSA	150 Å ²	Área superficial polar bidimensional máxima

A priori dos estudos de docagem molecular, a estrutura da enzima foi cuidadosamente inspecionada e em seguida refinada utilizando-se o módulo de preparação de estruturas para docagem contido no pacote de modelagem Maestro® (Schrödinger, Inc). Para isso, foram feitas as correções das ordens de ligação dos átomos localizados até 15 Å do ligante S70 (inclusive o NAD⁺) e a definição dos estados de protonação dos resíduos e moléculas dentro da região de interesse, como mostrado Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Estado de protonação definidos para os resíduos presentes na região preparada para o SBVS

Resíduo	Estado de protonação	Carga formal
S70	Desprotonado	-4
NAD	Desprotonado	-1
Cys	Protonada	Neutra
His	Protonada no nitrogênio delta	Neutra
Asp	Desprotonado	-1
Lys	Protonada	+1
Glu	Desprotonado	-1

Em seguida, foi feita a remoção de todas as moléculas de água de cristalização e a estrutura do complexo foi relaxada, através da minimização de energia, para o posicionamento adequado dos hidrogênios polares e redução de possíveis contatos desfavoráveis entre as cadeias laterais dos resíduos do sítio com o ligante ou com o cofator. Finalmente, após a minimização de energia apenas o ligante S70 foi extraído e as coordenadas das estruturas do ligante e da enzima preparadas foram salvas separadamente nos formatos mol2 e pdb, respectivamente, para utilização nas etapas posteriores.

A configuração dos parâmetros a serem utilizados nos SBVSs, foi estabelecida através de redocagens do ligante S70. Os parâmetros capazes de reproduzir a pose cristalográfica com menor RMSD em cada um dos softwares serviram como referência para a docagem da subcoleção de compostos obtida previamente. Da mesma maneira, foram estabelecidos os parâmetros adequados para a construção do banco de dados multiconformacional que é necessário como input na docagem molecular quando se faz uso do programa Fred. Este banco, por sua vez, é gerado através do programa Omega.

A Tabela 5.4 resume os parâmetros obtidos através da calibração feita para a geração do banco multiconformacional e redocagem do ligante S70 e adotados no emprego de cada um dos softwares utilizados. As listas completas dos parâmetros estão descritas no Apêndice A.

Tabela 5.4 - Resumo dos parâmetros utilizados na construção do banco de dados multiconformacional

Makefraglib (coleção e fragmentos)		
Parâmetro	Valor	Definição
buildff	mmff94	Campo de força usado no refinamento da estrutura inicial
FromCT	false	Uso de comprimento de ligações tabelados
Omega (banco de dados multiconformacional)		
buildff	mmff94s	Campo de força usado no refinamento da estrutura inicial
deleteFixHydrogens	false	Apagar e recolocar novos hidrogênios
fromCT	false	Uso de comprimento de ligações tabelados
enumNitrogen	false	Enumeração de nitrogênios planares (inversões)
enumRing	false	Enumeração das conformações de anéis (bote e cadeira)
ewindow	25 KJ mol ⁻¹	Janela de energia coberta pelos confôrmeros
maxconfs	300	Número máximo de confôrmeros para cada composto
rms	0,8	Desvio mínimo entre as coord. cart. dos confôrmeros finais
searchff	mmff94s	Campo de força usado na busca conformacional

Fred (preparação da grade de potencial)		
Parâmetro	Valor	Definição
box	S70.mol2	Referência para o centro da grade de potencial
addbox	6	Distância das paredes da grade a partir da referência
no_inner_contour	True	Contorno interno para restringir posição de ligantes
Fred		
num_poses	200	Número de poses geradas para cada ligante docado
exhaustive_scoring	chemgauss3	Função de pontuação utilizada na busca exaustiva

A docagem com o programa FlexX foi efetuada com apenas poucas modificações nos parâmetros em relação a configuração default do programa. Estas incluem o número máximo de poses geradas por ligante, modificado de 30 para 1, e a maneira de se obter as conformações de anéis (parâmetro RING_MODE), o qual foi modificado para valor 0, desta forma, as conformações dos anéis são lidas diretamente das coordenadas do input. Novamente as coordenadas do ligante S70 foram utilizadas como referência para o estabelecimento de uma região de 6 Å ao redor que seria considerada como sítio da docagem molecular. Tanto a geração dos confôrmeros quando as docagens foram submetidas em modo de processamento paralelo, implementados nos três programas (Omega, Fred e FlexX) através da interface PVM (Parallel Virtual Machine)¹³.

Após o término dos trabalhos, os valores das energias de interação com o alvo, calculados pela função de pontuação de cada programa, foram coletados dos outputs e ordenados da melhor para a pior pontuação. Em seguida as listas foram fundidas e somente aqueles compostos pontuados entre os 10 mil primeiros por ambos os programas deram origem a uma nova lista formada por uma matriz 10000x3 com os códigos das moléculas e energias de interação alinhadas (i.e., código ZINC – energia Fred – energia FlexX). Nesta ultima, os valores das energias em cada coluna foram autoescalados através da Equação 5.1.

$$E_{I,J, autoesc} = \frac{E_{i,j} - E_{j, min}}{E_{j, max} - E_{j, min}}$$

Equação 5.1 - Autoescalamento das energias obtidas através das docagens com diferentes programas: $E_{i,j}$ é o valor da energia calculada pela função de pontuação do programa que deu origem à coluna j (por exemplo, a pontuação do FlexX) para o composto i ; $E_{j,min}$ é o menor valor de energia entre as 10000 moléculas da coluna j , e $E_{j,max}$ o maior valor de energia obtido dentro da coluna j

A soma algébrica entre os valores autoescalados da coluna j e $j+1$ originaram a coluna da análise consensual das energias. Esta, por sua vez, foi ordenada e as 5000 moléculas mais bem classificadas foram usadas para constituir a coleção de compostos que foi empregada nos estudos subsequentes de SBVS utilizando-se o programa Autodock.

A adequação da estrutura da enzima para a docagem utilizando-se o programa Autodock, foi feita através de sua interface AutodockTools (ADT). Para isso, a estrutura previamente refinada na primeira etapa teve todos os hidrogênios não-polares removidos e cargas de Gasteiger¹⁴ adicionadas. Então, a definição da região do sítio na qual as moléculas seriam docadas foi escolhida utilizando-se como referência uma caixa cúbica com as mesmas coordenadas e dimensões utilizadas para o programa Fred, originando assim uma grade com resolução de 0,375 Å centrada nas coordenadas 21,6, -15,85 e 18,0 e dimensões contendo 54x46x44 pontos, nas direções x, y e z, respectivamente. Por último, foram gerados os mapas de potenciais para os átomos contidos dentro desta região.

Em seguida, estruturas 3D das 5000 moléculas previamente selecionadas foram preparadas pela adição das cargas de Gasteiger e pela definição das ligações flexíveis durante o processo de busca conformacional, utilizando-se o protocolo descrito na documentação do programa para ensaios virtuais de grandes coleções de compostos.¹⁵ Todos os graus de liberdade rotacionais presentes nos ligantes foram permitidos, exceto as ligações do tipo peptídicas.

Uma vez estabelecidos os tipos de átomos presentes nos compostos da coleção, o AutodockTools foi novamente utilizado para gerar todos o mapas de potenciais correspondentes.

Assim como realizado previamente com os programas FlexX e Fred, a molécula S70 foi redocada na região da enzima selecionada, para verificação da consistência dos parâmetros que seriam adotados na docagem da coleção contendo os 5000 compostos. A Tabela 5.5 mostra a configuração final adotada para os parâmetros; todos os demais foram mantidos nas configurações default do programa.

Tabela 5.5 - Parâmetros usados para a docagem molecular com o programa Autodock

Parâmetro	Valor	Definição
Search method	LGA	Algoritmo de busca utilizado
ga_pop_size	150	Número de indivíduos na população conformacional inicial a ser avaliada
ga_num_evals	1750000	Número máximo de avaliações de cada membro da população inicial
ga_run	100	Número de vezes que a população inicial de confôrmeros será gerada

Após a docagem os valores das energias calculados pela função de pontuação foram colhidos, e o grupamento de poses gerado através das ferramentas de análise do programa ADT. Os valores das energias juntamente com a análise de grupamentos, complementaridade poses com a forma do sítio e ligações de hidrogênio para, pelo menos, os 2000 primeiros compostos foram visualmente inspecionados para a seleção dos 60 melhores candidatos para avaliação *in vitro*. Ao final, 12 moléculas representativas das classes contidas entre os melhores compostos foram selecionados, adquiridos comercialmente e testados *in vitro* contra a enzima TcGAPDH.

Os testes *in vitro* contra a enzima foram realizados pelo doutorando do grupo NEQUIMED-PN, Helton José Wiggers. Estes consistiram de duas etapas.

Primeiramente, foram realizados experimentos espectrofotométricos utilizando-se um equipamento Shimadzu UV-1800 para a determinação do percentual de inibição. As condições do ensaio foram elaboradas para um volume total de 600 μL contendo 100 mM de solução tampão de TEA-HCl, 1mM de EDTA, 1 mM de 2-mercaptoetanol, 30 mM de NaHAsO_4 , 400 mM de NAD^+ , 20 nM de TcGAPDH, 300 μM de *D*-G3P, 5% v/v de DMSO, a 25°C e pH 7,5. O experimento controle foi realizado na ausência do inibidor e em seguida na presença de 200 μM da substância a ser avaliada. A reação foi iniciada após a adição da enzima e foi monitorada a formação do produto NADH no comprimento de onda de 340 nm ($\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) durante 120 s. Antes de realização dos ensaios de inibição, as soluções contendo cada inibidor e os demais componentes (exceto a enzima), tiveram o espectro varrido de 200 a 600 nm para avaliar a região de absorbância das moléculas e possíveis interferências no comprimento de onda da análise.

As medidas foram tomadas em no mínimo duplicatas e a atividade da enzima foi monitorada individualmente para cada inibidor. A velocidade da reação foi

calculada pela lei das velocidades inicial e os percentuais de inibição foram calculados a partir da Equação 5.2.

$$\%I = \left(1 - \frac{V_i}{V}\right) \cdot 100$$

Equação 5.2 - Cálculo do percentual de inibição: V_i é a velocidade da reação na presença do inibidor, que neste caso corresponde à taxa de formação do NADH (absorbância em função do tempo) obtida através de ajuste linear no intervalo entre 30 e 80 s da reação, na presença do inibidor; V corresponde à taxa de formação do produto na ausência de inibidor.

Na segunda etapa dos ensaios enzimáticos, somente os compostos cujo percentual de inibição foi superior a 50% nos experimentos espectrofotométricos, foram avaliados através de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) para a determinação da constante de inibição (K_i). Todos os experimentos de ITC foram realizados em equipamento VP-ITC da Microcal (Northampton, MA).

O volume da cela de referência foi completado com água previamente degaseificada com agitação constante durante 5 minutos através do ThermoVac. As soluções usadas na cela de amostra e na seringa também foram previamente degaseificadas (também com agitação constante) por 5 minutos com o intuito de eliminar bolhas de ar da solução e desta maneira evitar ruídos no sinal obtido pelo aparelho.

Uma seringa de 2,5 mL do tipo “livre de gás” (gastight - Hamilton) foi usada para preencher as celas de amostra e de referência. A solução foi lentamente injetada para evitar a formação de bolhas. Após a inserção da solução, foram realizados movimentos em círculo e também verticais com a seringa para assegurar a retirada de todas as bolhas. A cela do calorímetro usado apresenta um volume nominal de 1,427 mL. Contudo, nos experimentos foram preparados sempre 2 mL de solução. O excesso era retirado após o preenchimento da cela, posicionando a seringa numa saliência localizada imediatamente acima da cela de amostra.

A seringa do calorímetro apresenta um volume de 284,21 μ L. Esta foi preenchida lentamente, e em seguida purgada duas vezes novamente para eliminar qualquer possível bolha. Após o preenchimento da seringa, as gotas de líquido da superfície da seringa foram secadas com papel para evitar a introdução de erros no volume.

Ao se iniciar os experimentos, é requerido um tempo para a estabilização da temperatura (± 5 minutos). Em seguida, o aparelho começa a estabilizar a linha base que dura em torno de 15 minutos. Após o período de estabilização preliminar, um tempo adicional de 60 s foi estabelecido para se gerar a linha base usada na análise. Em todos os experimentos a velocidade de rotação da seringa foi de 307 rpm e a temperatura de 25°C. A potência térmica ($\mu\text{cal s}^{-1}$) foi registrada em função do tempo. Os dados foram coletados pelo software VPViewer a cada 2 segundos.

A entalpia aparente de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato foi determinada preenchendo-se a cela de amostra com o tampão TEA-HCl (100 mM; pH 7,5), NaHAsO_4 30 mM, *D,L*-Gliceraldeído-3-fosfato 1 mM e NAD^+ 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a enzima TcGAPDH 1,92 μM diluída em um tampão idêntico ao da cela de amostra, com o intuito de minimizar ao máximo os calores de mistura e diluição. Nos experimentos realizados neste trabalho, o fosfato, que é um dos substratos da GAPDH, foi substituído pelo arseniato, já que o produto formado durante a reação (1,3-BPG) inibe a enzima.

O substrato foi titulado pela injeção de 10 μL de enzima durante 20 segundos. Após a injeção, a concentração final da enzima na cela era de 13,5 nM. Uma segunda injeção de enzima foi feita 30 minutos após a primeira para comprovar o completo consumo do G3P na reação. Além disso, a entalpia aparente da reação também foi determinada na presença de 5% de DMSO seguindo o mesmo procedimento anterior.

Os ensaios de inibição foram realizados primeiramente determinando-se os parâmetros cinéticos do substrato G3P (K_M e k_{cat}), os quais foram utilizados para a determinação da curva de Michaelis-Menten sob condições de pseudo-ordem. Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório.¹⁶ A seringa foi preenchida com *D,L*-G3P 5 mM em tampão TEA-HCl 100 mM pH 7,5 e 5% DMSO. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO_4 30 mM, NAD^+ 1,5 mM e a enzima GAPDH 5 nM. O experimento controle foi realizado na ausência e o de inibição da presença de 50 μM do inibidor. O substrato foi titulado sobre a enzima através de 20 injeções, sendo a primeira de 2 e o restante de 4 μL , com intervalos entre elas de 60 segundos.

Todos os experimentos foram realizados ao menos em duplicata. Os dados referentes à concentração do substrato, $[\text{S}]$, e a velocidade da reação, v , foram

obtidos usando o programa Origin através do modo “Ensaio Enzimático” desse programa de acordo com o “método 2: somente substrato”. Esse método é usado quando o experimento é realizado através de múltiplas injeções. Os dados obtidos foram exportados do programa Origin para o programa SigmaPlot v.10.0¹⁷ e as constantes K_M , k_{cat} , V_{max} e K_i foram determinadas através do ajuste não-linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten e considerando-se os mecanismos de inibição competitivo, não-competitivo e incompetitivo. O mecanismo foi determinado conforme melhor ajuste avaliado pelos parâmetros estatísticos.

5.2. Resultados e discussão

5.2.1. Análise das estruturas tridimensionais da enzima GAPDH

Previamente ao processo de docagem molecular, é necessária a seleção e preparação das estruturas 3D do alvo macromolecular de interesse, da escolha da região da enzima na qual o SBVS será realizado e da coleção de compostos a ser docada no sítio selecionado.

Atualmente estão depositadas no PDB cinco estruturas da enzima TcGAPDH na forma holo. Estas estão complexadas com cinco diferentes inibidores. Quando este trabalho teve início, apenas três delas estavam disponíveis, que correspondem aos códigos 1K3T, 1ML3 e 1QXS. As outras duas estruturas correspondentes aos códigos 3DMT e 3IDS foram depositadas apenas recentemente e por esse motivo não foram consideradas.

No modelo 1K3T a estrutura da TcGAPDH foi resolvida em complexo com a Chalepina, um derivado natural de Cumarina identificado por Marchi *et al.*^{18,19} As estruturas 1ML3 e 1QXS foram obtidas em complexo com um análogo do substrato (G3P) e do produto, respectivamente.^{20,21} As estruturas químicas desses compostos são mostrados na Figura 5.2 enquanto que uma discussão mais detalhada dos processos de identificação dos mesmos é encontrada nas seções 3.1.3 e 3.1.4. A análise desses complexos cristalográficos revelou características estruturais importantes para a seleção da estrutura e sítio de ligação mais adequados para o ensaio virtual.

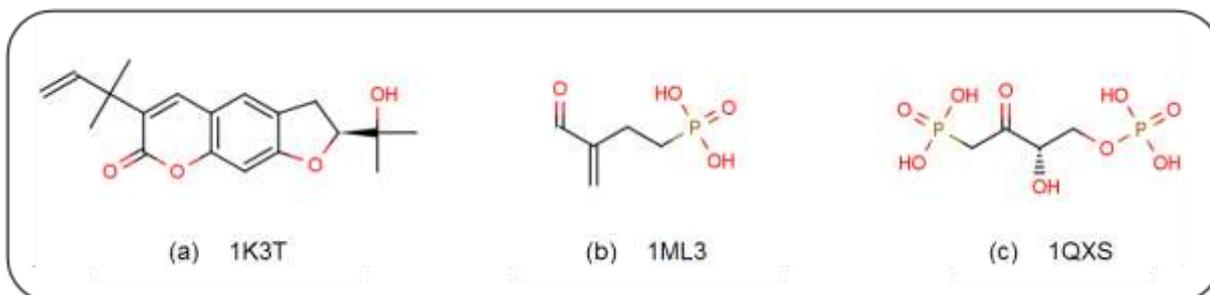


Figura 5.2 - Inibidores complexados com as estruturas da enzima TcGADPH depositadas no PDB. (a) BRZ; (b) CYX; (c) S70.

Inicialmente foi feita uma análise dos parâmetros que determinam a qualidade e a confiabilidade das estruturas cristalográficas usadas nesse trabalho (Tabela 5.6). Essa análise é importante já que as incertezas introduzidas durante a construção de um modelo atômico a partir dos dados da densidade eletrônica observada não são sempre avaliadas completamente. Incertezas no modelo atômico podem ter consequências significativas quando esse modelo é usado posteriormente como base para estudos de modelagem molecular ou docagem e pontuação, por exemplo.²²

Tabela 5.6 - Código PDB do modelo, parâmetros estruturais e ligantes complexados.

Código	Resolução (Å)	R _{factor}	R _{free}	(R _{free} - R _{factor})	Ligante
1K3T	1,95	0,201	0,280	0,079	BRZ
1QXS	2,75	0,202	0,276	0,074	S70 e NAD
1ML3	2,50	0,199	0,264	0,065	CYX e NAD

Um parâmetro importante nos estudos cristalográficos é a resolução dos dados. Como a resolução é expressa em Angstroms (Å), valores pequenos significam uma resolução mais alta. Quanto maior a resolução, maior a quantidade de dados coletados experimentalmente e mais confiáveis (em termos de acurácia e precisão) pode se esperar que sejam os modelos construídos utilizando-os como base. Em altas resoluções (<1,5 Å) o modelo é provavelmente mais que 95% uma consequência dos dados observados. Por outro lado, em baixas resoluções (>2,5 Å), a modelagem dos detalhes nas estruturas das proteínas é muito mais subjetiva do que baseada nas informações experimentais.²²

A habilidade do modelo em explicar os dados experimentais é usualmente acessada por meio do parâmetro chamado R_{factor}. Este parâmetro mede a concordância entre o modelo cristalográfico e os dados experimentais, porém, está

sujeito ao superajuste (do inglês, *overfitting*) e, como consequência, à geração de modelos não-reais. Para minimizar este problema, Brünger introduziu o conceito de validação cruzada no refinamento cristalográfico com o parâmetro chamado R_{free} .²³ O parâmetro R_{free} tem a mesma definição que R_{factor} , porém, é calculado para um número bem menor de reflexões que não são usados para a construção do modelo final. Com obtenção de R_{free} é possível monitorar o processo de refinamento e checar se R_{factor} não está sendo diminuído artificialmente devido ao excesso de parâmetros inseridos no modelo.

Tanto R_{factor} quanto R_{free} dependem da resolução dos dados, mas como regra geral os valores de R_{free} devem ser aproximadamente a resolução em Angstroms dividido por 10. Assim, um conjunto de dados com resolução de 2 Å idealmente deve resultar em um $R_{\text{free}} \sim 0,2$. Modelos com R_{free} superior a este valor devem ser tratados com cautela.²⁴

Uma vez que um bom modelo cristalográfico é escolhido com base na diferença entre os parâmetros R_{free} e R_{factor} , esta pode ser considerada uma medida da extensão na qual o modelo se super-ajusta aos dados, logo, $R_{\text{free}} - R_{\text{factor}}$ deve ser pequena para o modelo final, idealmente $<0,05$. Com base nestes fatores e nos dados mostrados na Tabela 5.6, podemos concluir que o modelo com parâmetros estruturais mais apropriados para aplicação de estudos de modelagem molecular ou de SBVS seria o 1K3T.

A análise dos complexos cristalográficos da GAPDH de *T. cruzi* revelou um alto grau de conservação da estrutura terciária do domínio de ligação do substrato. A sobreposição dos três monômeros (1QXS:A, 1ML3:B, 1K3T:C) que contêm os ligantes complexados em cada uma das estruturas, feita com base nos carbonos-alfa ($C\alpha$) dos resíduos de aminoácidos constituintes, apresenta valores de RMSD entre 0,635 - 0,742 Å. Este fato indica que, apesar da diferença entre os ligantes complexados, existe apenas um pequeno rearranjo estrutural dos sítios de ligação do substrato entre os diferentes complexos da TcGAPDH.

Conforme descrito na seção 3.1.1 a enzima GAPDH utiliza uma molécula de substrato e uma molécula de cofator para a catálise enzimática. Dessa forma, essa enzima apresenta dois sítios distintos de ligação, um para a molécula do substrato e outro para a molécula do cofator. Das estruturas disponíveis no PDB, apenas a 1ML3 e 1QXS foram cristalizadas com o cofator NAD^+ ocupando o respectivo sítio.

Uma análise topológica²⁵ do sítio ativo na presença e na ausência do cofator utilizando-se a estrutura 1QXS resultou nos dados mostrados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Parâmetros topológicos dos sítios do cofator e do substrato na enzima TcGAPDH

Sítio	Volume (A ³)	Área (A ²)
NAD ⁺	2277	1176
G3P	1452	749
NAD ⁺ + G3P	3729	1925

Conforme evidenciam os dados mostrados na Tabela 5.7, devido à grande diferença no tamanho molecular entre o substrato e o cofator, as regiões com as quais cada um deles interage é bastante distinta tanto em termos de extensão quanto a forma.

O sítio ocupado pela molécula de NAD⁺ é bastante extenso e plano. Neste sítio existem essencialmente duas cavidades mais pronunciadas. Uma delas situa-se na região ocupada pelo anel purínico do cofator NAD⁺ e a outra ocupada pelo anel de nicotinamida da mesma molécula. A primeira região já foi explorada previamente por Gelb *et al.* para o planejamento de inibidores derivados de adenosina seletivos contra GAPDHs de diferentes espécies de tripanossomatídeos. Mais de cem compostos foram sintetizados e testados, mas apesar da obtenção de um inibidor com potência (IC₅₀) igual a 0,10 nM (Figura 5.4),²⁶⁻³⁰ nenhum trabalho posterior relata estudos envolvendo a evolução do composto para a Fase Clínica.

Talvez isso possa ser atribuído ao fato de que potência não é o único fator a ser levando em consideração quando se seleciona um composto-líder para otimização a fármaco, mas também a qualidade dos compostos obtidos inicialmente deve ser levada em conta. Hopkins *et al.* propuseram uma métrica para normalizar o efeito do aumento potência causado pelo aumento inexorável do peso molecular que ocorre durante o processo de otimização molecular. Esta métrica está relacionada ao conceito de Eficiência do Ligante (LE, do inglês, *Ligand Efficiency*) de um composto.³¹

A Eficiência do Ligante, definida pela Equação 5.3, é uma estimativa do quanto cada átomo presente em uma molécula contribui para a interação com o alvo. Esta pode ser usada para acessar a qualidade dos ligantes encontrados nos ensaios iniciais e também para monitorar a qualidade dos compostos-líderes à medida que estes são otimizados.

$$LE = \frac{-RT \ln K_i}{N} = \frac{\Delta G_{int}}{N}$$

Equação 5.3 - Cálculo da Eficiência do Ligante: R é a constante dos gases, T é a temperatura absoluta, K_i é a constante de afinidade, N é o número de átomos pesados (i.e., diferentes de Hidrogênio) presentes na molécula e ΔG_{int} é a energia livre de interação da molécula com o alvo. Na prática, para fins de comparação, K_i pode ser substituído pelo valor de IC_{50}

O gráfico da Figura 5.3 ilustra como o conceito de Eficiência do Ligante está relacionado com a tratabilidade química de um ligante, ou seja, as possibilidades de um determinado composto ser otimizado e ao final possuir não só alta afinidade pelo alvo, mas também características físico-químicas que permitam o ajuste fino de suas propriedades farmacocinéticas. Para obter um composto otimizado com potência de 10 nM que se enquadre dentro do peso molecular proposto por Lipinski para biodisponibilidade oral (i.e. MW < 500 Da, área em vermelho no gráfico),³² o número máximo de átomos que este deve possuir é ~36, o que leva a uma LE por volta de 0,29 kcal mol⁻¹ átomo⁻¹. Este valor pode ser visto como a LE mínima necessária para que um composto, depois de otimizado, possua uma característica fármaco-similar, e é representado pela linha transversal que separa as regiões de alta e baixa Eficiência do Ligante no gráfico da Figura 5.3. Quanto mais próximo da área de alta eficiência do ligante um determinado composto se localizar, maior a probabilidade do mesmo ser otimizado e alcançar a área delimitada pelo retângulo vermelho.

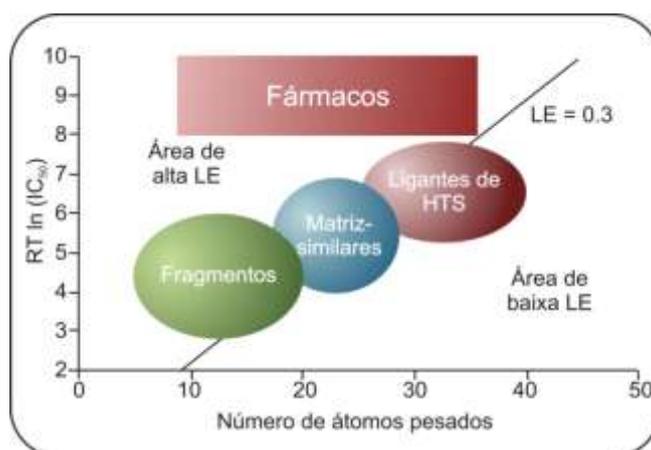


Figura 5.3 - Evolução de um ligante a composto-líder segundo suas características moleculares. Quanto mais à esquerda do gráfico maior a tratabilidade química de um ligante

Assim, fragmentos moleculares são geralmente mais promissores que moléculas similares a compostos-líderes, que por sua vez são mais promissoras que a maioria das moléculas geralmente encontradas através de ensaios em massa.

Compostos cuja eficiência do ligante os localiza fora das áreas delimitadas pelas elipses e na região de baixa eficiência, possuem muito poucas chances de serem otimizadas e alcançar características fármaco-similares. Este é exatamente o caso do composto (a) na Figura 5.4, ligante que deu origem ao inibidor mais potente da série planejada por Gelb *et al* (Figura 5.4 (b)).

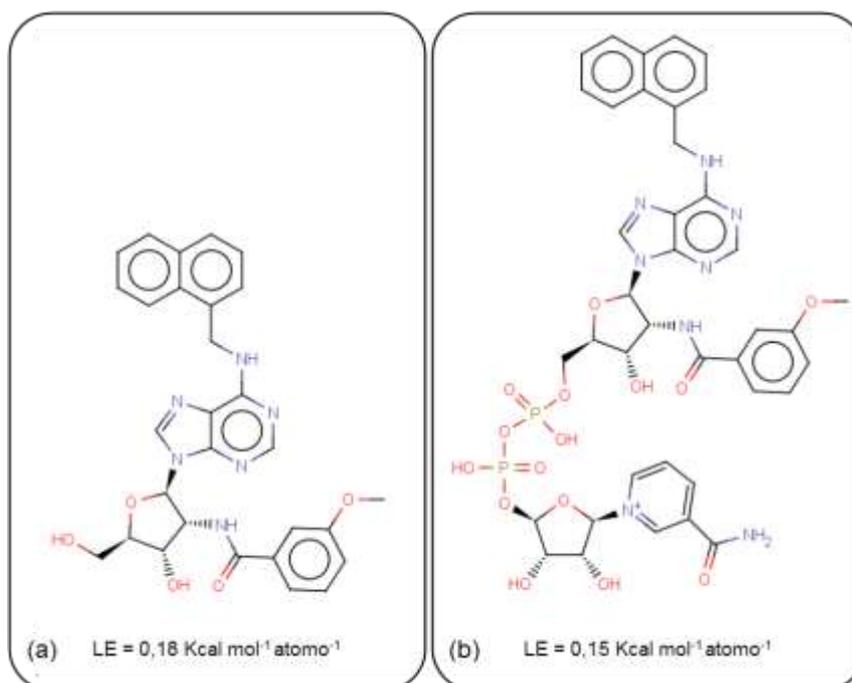


Figura 5.4 - (a) ligante e (b) composto-líder da série planejada por Gelb *et al*²⁶⁻³⁰

O composto (a) da Figura 5.4 exibe uma eficiência de ligante igual 0,18 Kcal mol⁻¹ átomo⁻¹, e de fato não caracteriza um bom ponto de partida para otimização. Tanto isso é verdade que o composto-líder obtido através de sua otimização (Figura 5.4 (b)) possui peso molecular igual 923 Da e uma LE de apenas 0,15 Kcal mol⁻¹ átomo⁻¹. Como consequência da seu alto peso molecular, provavelmente deve possuir parâmetros ADME bastante inapropriados para utilização como fármaco. Este fato pode ter desencorajado a tentativa de otimização desse último.

De fato, o planejamento de moléculas pequenas para um sítio extenso e plano, como é o sítio do NAD⁺ na TcGAPDH, não é uma tarefa trivial devido a falta de cavidades capazes de prover interações específicas estáveis para um possível ligante. Este tipo de topologia torna o processo de planejamento bastante complicado e muitas vezes, na ausência de outra cavidade, o alvo também pode ser considerado não muito interessante para SBDD.^{33,34}

A análise das interações do inibidor S70 complexado com a estrutura da TcGAPDH (Figura 5.5), revela que um dos oxigênios do grupo fosfato que ocupa o sítio P_s, interagem através de ligação de hidrogênio com a hidroxila do anel glicosídico do cofator. A cavidade ocupada pelo ligante está localizada na região do sítio catalítico, e é formada por resíduos de extrema importância para atividade da enzima, como a Cisteína catalítica (Cys166) e His194, resíduos que constituem o sítio P_i (Thr167, Thr226 e Ser247, Arg249), e os que formam o sítio P_s (Thr197 e Thr 199, Arg249, NAD⁺).

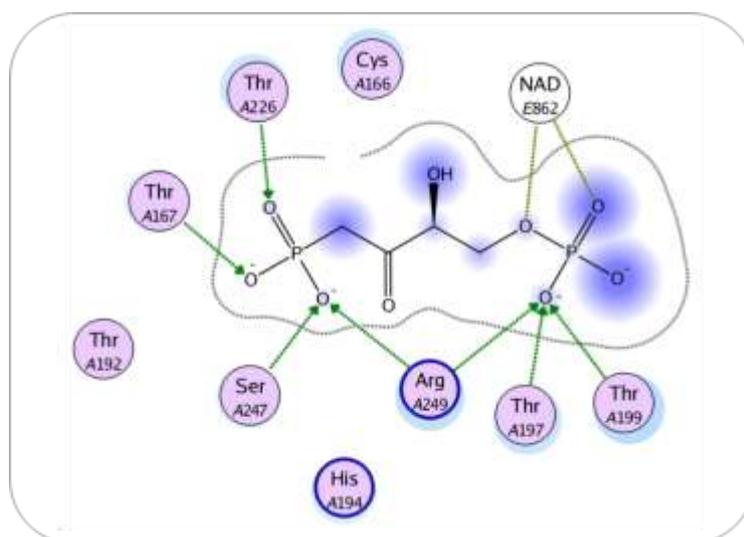


Figura 5.5 - Mapa de interações da molécula S70 com o sítio ativo da TcGAPDH na estrutura 1QXS, Figura gerada com o programa MOE³⁵

A representação do complexo S70-GAPDH pela superfície de van der Waals com o NAD⁺ no sítio (Figura 5.6 (a) e (b)), evidencia que a importância do cofator não se caracteriza apenas pela doação de ligação de hidrogênio através de sua hidroxila glicosídica, mas também pela definição de uma cavidade para acomodação e interação do grupo fosfato do ligante. Sabe-se, de acordo com o mecanismo (vide seção 3.1.1), que o cofator entra primeiro no sítio ativo para que a catálise ocorra. Este fato é bastante relevante, uma vez que o sítio de interação formado após a interação do cofator constitui uma cavidade menos extensa (Tabela 5.7) e mais definida (em verde na Figura 5.6 (b)) para a interação do substrato. Por esse motivo esta região possui características bem mais atrativas do ponto de vista do planejamento de inibidores que a utilizada por Gelb *et al.*, uma vez que é capaz de acomodar ligantes bem menores.

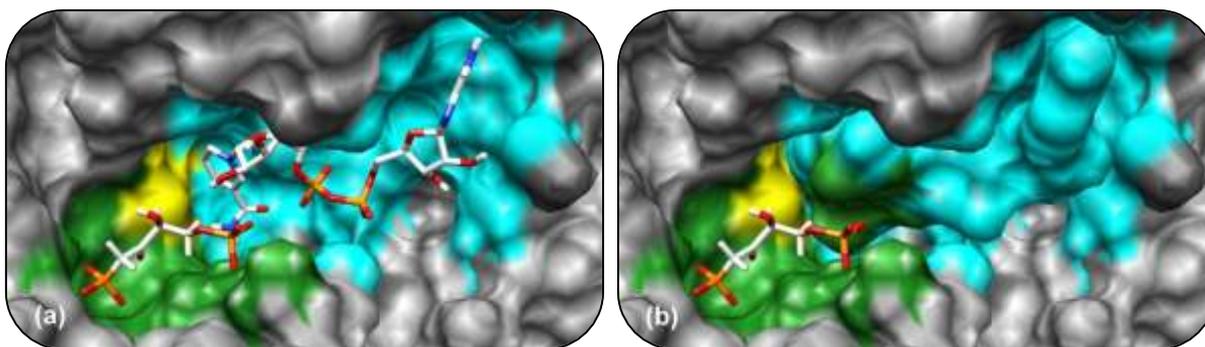


Figura 5.6 - (a) Representação da estrutura da TcGAPDH através da superfície de van der Waals. Regiões distantes até 4 Å dos compostos S70 e NAD⁺ foram coloridas em verde e azul, respectivamente, para representar a extensão das cavidades ocupadas por cada um; a superfície da Cys166 está colorida em amarelo e serve como referência na análise (b) A representação da superfície de van der Waals do cofator revela o papel do mesmo na formação de uma cavidade mais bem definida para interação do ligante, fato que também mesmo ocorre para a interação do substrato

Com base nessas análises, decidiu-se focar nesta região para a busca de inibidores utilizando-se docagem molecular. Entretanto, das três estruturas cristalográficas da TcGAPDH disponíveis, apenas a 1QXS e a 1ML3 foram cristalizadas com o cofator no sítio. Destas, somente a primeira com inibidor reversível.

Após o alinhamento dos C α das cadeias A e B (as que contêm os ligantes complexados) das estruturas 1QXS e 1ML3, respectivamente, foi feita uma comparação minuciosa das posições das cadeias laterais dos pares de resíduos localizados até 8 Å do ligante S70. Observou-se que as cadeias laterais não possuem ângulos χ significativamente distintos em ambas as estruturas. Isto se deve provavelmente ao fato de as posições alternadas do grupo fosfato da molécula CYX (da estrutura 1ML3) ocuparem tanto sítio P_i quanto o P_s, tal como ocorre com o ligante S70 (na estrutura 1QXS). Deste modo, ambas as moléculas interagem essencialmente da mesma maneira, resultando em conformações dos resíduos praticamente iguais. Assim, para evitar a utilização da estrutura 1ML3 com a Cys166 modelada, optou-se pelo uso da estrutura 1QXS, mesmo esta apresentando a menor resolução dentre as duas. Uma vez escolhida a estrutura cristalográfica mais apropriada, esta foi então adequadamente preparada para os estudos posteriores de SBVS.

5.2.2. Análise do sítio ativo

Através do alinhamento das sequências primárias de aminoácidos das enzimas TcGAPDH e HsGAPDH, podemos perceber que estas enzimas compartilham de um alto grau de identidade (mesma sequência primária de aminoácidos, em vermelho na Figura 5.7). O alinhamento das estruturas tridimensionais revela que os 52,8% de identidade entre elas reflete em alta similaridade da estrutura terciária das duas enzimas, uma vez que o RMSD entre as coordenadas cartesianas dos C α nas estruturas 1QXS e 1U8F (HsGAPDH) é de apenas 0,997 Å. Além disso, quando levados em conta apenas resíduos não mais distantes que 8 Å do ligante S70 complexado com a estrutura 1QXS, o grau de identidade cresce para 84,1%.

Apesar do elevado grau de identidade entre as enzimas, quatro resíduos do sítio ativo podem ser explorados na busca por ligantes seletivos pela enzima do parasito. Esses resíduos são a Ser247, Ser224, Asp210 e Gly213, que na enzima de humanos são substituídos por Ala232, Ala209, Leu195 e Asp198, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 5.8, estes resíduos estão localizados em regiões adequadas para que um ligante possa interagir e competir pelo sítio de interação do substrato e inibir o processo de catálise. Particularmente, a substituição de duas Serinas na enzima do parasito por duas Alaninas elimina a capacidade da enzima de humanos em fazer ligações de hidrogênio nestas posições com possíveis ligantes. Além disso, a polarizabilidade do sítio ativo também muda, sendo este mais hidrofóbico na enzima de humanos em virtude da presença das Alaninas.

O sítio ativo da TcGAPDH é bastante hidrofílico para poder acomodar o grupo fosfato do substrato pelo mecanismo *flip-flop*, apresentando dois sub-sítios catiônicos (P_i e P_s) que estabilizam as cargas negativas do ligante S70 através de sete ligações de hidrogênio (Thr167, Thr224, Ser247, Thr197, Thr199, e NAD⁺) e duas interações eletrostáticas com a Arg249 (Figura 5.5). Como já discutido na seção 3.1.2, alguns estudos evidenciam o papel importante desse resíduo no processo catalítico, induzindo a saída do produto do sítio ativo após a etapa de fosforilação através de sua compressão.

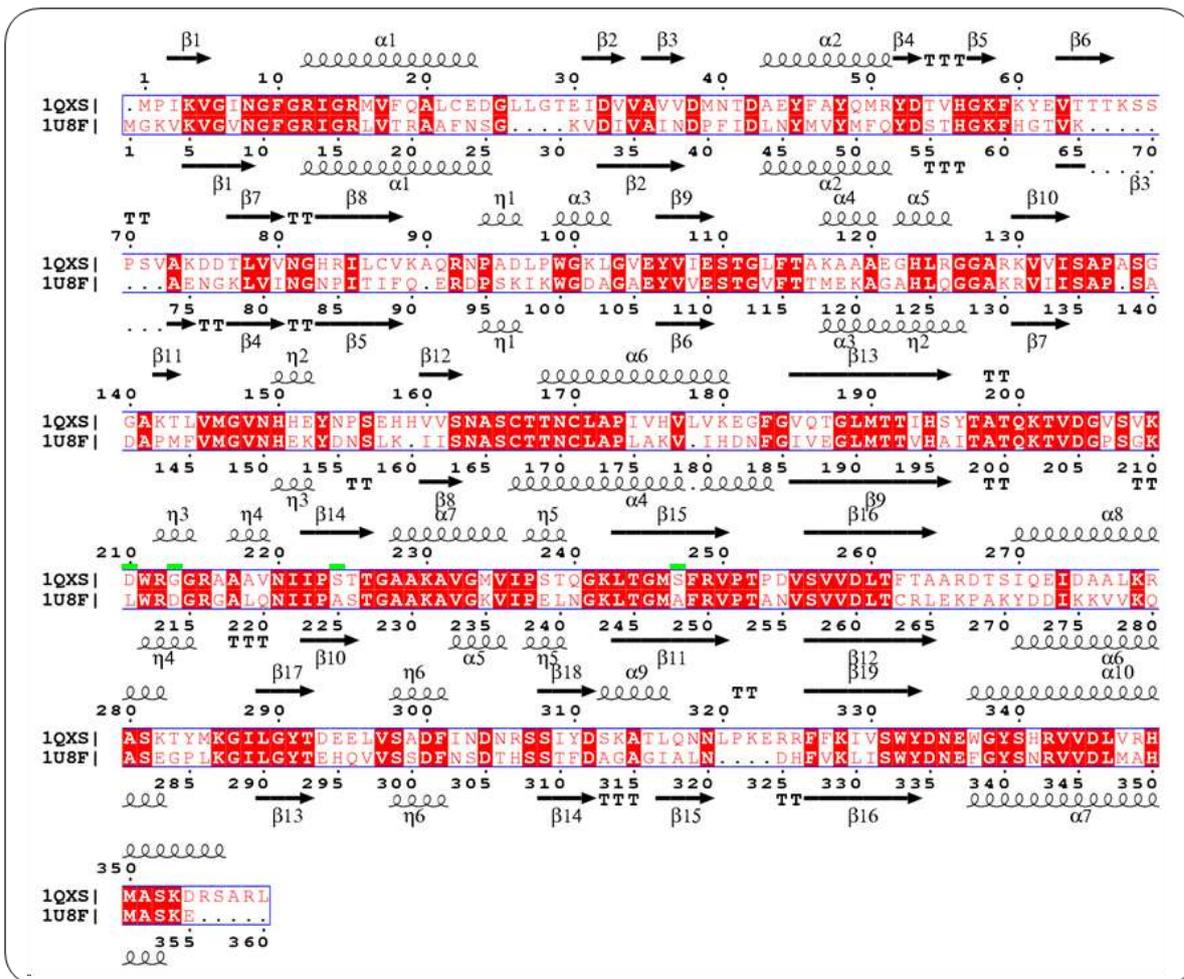


Figura 5.7 - Alinhamento das seqüências primárias das enzimas TcGAPDH e HsGAPDH, Os resíduos do sítio ativo que podem ser explorado para se obter seletividade entre as duas enzimas estão marcados com traço verde. Alinhamento gerado no servidor on-line ESript³⁶

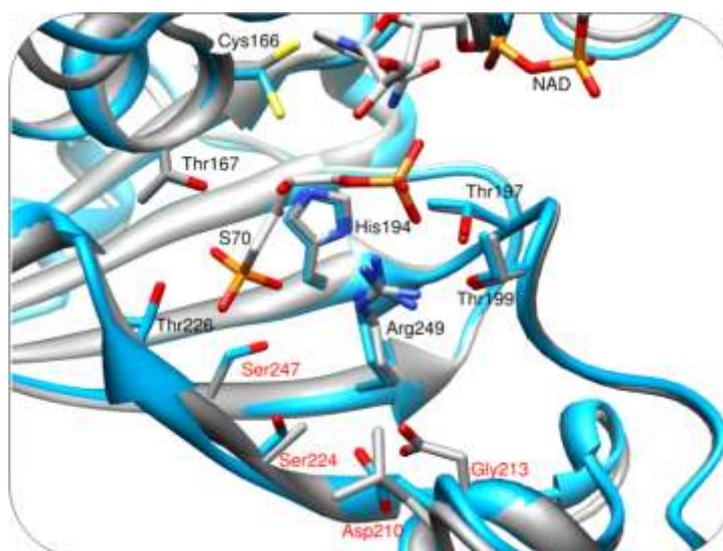


Figura 5.8 - Alinhamento tridimensional das enzimas TcGAPDH (azul) e HsGAPDH (cinza). Os resíduos do sítio ativo que podem ser explorados para seletividade são indicados em vermelho. Figura gerada com o programa Chimera³⁷

Na ausência do substrato o resíduo Arg249 forma uma forte interação eletrostática com um resíduo de Aspartato (Asp210), um dos resíduos distintos entre a enzima do parasito e a de humanos e que pode ser usado para se gerar seletividade entre as mesmas.³⁸ Outro fator importante a ser considerado sobre o sítio ativo da TcGAPDH é a presença dos vários resíduos de Serina e Treoninas nesta região. A propriedade anfiprótica destes resíduos, ou seja, suas capacidades de interagir com possíveis ligantes tanto através da doação quanto aceitação de ligação de hidrogênio também é uma característica que pode ser explorada durante o planejamento de inibidores.

5.2.3. Coleção de compostos com propriedades adequadas

5.2.3.1. *Banco de dados*

A seleção de moléculas a serem testadas contra a enzima TcGAPDH teve como base a possibilidade de aquisição comercial das mesmas; por isso, a subcoleção de compostos comercialmente disponíveis contidas no banco de dados ZINC foi escolhida como ponto de partida para a busca.

O ZINC é um banco de dados de domínio público disponível na rede mundial de computadores que contem cerca de 20 milhões de estruturas químicas. Dentre elas encontram-se subcoleções de compostos comercialmente disponíveis (~13 milhões), não-comercialmente disponíveis, ou ainda estruturadas em outras subcoleções de acordo com as propriedades físico-químicas dos compostos, tais como o peso molecular, a área superficial polar, $\log P$, número rotações livres, número de aceptores ou doadores de ligação de hidrogênio. As estruturas moleculares dos compostos são disponibilizadas em diferentes tipos de representações (e.g., SMILES, Tripos mol2), em coordenadas bi ou tridimensionais, e em estados protonação que podem se adequar a diferentes propósitos:²

- pH = 7 – para estudos de similaridade 2D, por exemplo;
- pH baixo (4,5-7,0) – para estudos de docagem em sítios positivamente carregados;
- pH médio (5,85-8,25) – para docagem com propósito mais geral;
- pH alto (7,0-9,5) – para estudos de docagem em sítios contendo metais.

Para realização desta etapa, a coleção contendo estruturas das moléculas em pH médio foi escolhida, pois os ensaios *in vitro* são realizados em pH 7,5.

Diante do vasto espaço químico da coleção virtual inicial de moléculas, fez-se necessário selecionar apenas os compostos cujas características estruturais e propriedades físico-químicas os tornam mais promissores como ligantes. Por esse motivo, uma primeira filtragem para retirada das moléculas com propriedades ou fragmentos conhecidamente inapropriados ou indesejáveis foi feita utilizando-se programa FILTER.

5.2.3.2. *Filtros de Seleção*

O desenvolvimento de um fármaco está sujeito ao insucesso devido à combinação de propriedades farmacocinéticas inadequadas, toxidez em animais, falta de eficácia e até mesmo efeitos adversos em humanos. As reações adversas observadas em humanos não são somente a forma mais frequente de falha no desenvolvimento de um fármaco, como também geralmente ocorrem nas últimas etapas dos testes clínicos ou depois que o medicamento já foi lançado no mercado. Nesta fase, muita pesquisa e investimentos foram realizados.^{39,40}

Contudo, a maioria dos efeitos adversos está frequentemente relacionada a propriedades ADME/Tox que podem ser preditas. Hoje, para a descoberta e desenvolvimento de um fármaco existem métodos mais eficientes para selecionar e testar compostos em relação às suas propriedades ADME/Tox antes que estes alcancem as fases mais avançadas do processo. A utilização destes métodos iniciou-se nos anos 90, aproximadamente uma década depois que os métodos computacionais começaram a ser aplicados para ajudar na predição de estruturas de alvos e otimização de ligantes.^{39,41}

Em paralelo com a evolução desses métodos, muitos estudos deram origem a regras e filtros moleculares usados para a predição da solubilidade ou potencial para absorção dos compostos.^{32,42} Tais estudos foram feitos a partir da análise de grandes bancos de dados ou de coleções de compostos de companhias farmacêuticas. Analogamente, foram desenvolvidas ferramentas para discriminar compostos fármaco-similares de não-fármaco-similares,^{43,44} diferenciar compostos-líderes de fármacos,⁴⁵ descrever características estruturais comuns entre fármacos conhecidos,^{46,47} e a compilação de dados acerca de esqueletos geralmente

envolvidos em mecanismos de inibições não-específicos que caracterizam falsos-positivos nas avaliações *in vitro*.⁴⁸

Lipinski *et al.*⁴⁹ deram uma grande contribuição neste sentido, quando analisaram um série de fármacos testados clinicamente para tentar determinar se estes possuíam alguma propriedade capaz de propiciar a distinção entre os mesmos. Os resultados desta análise levaram à proposição da *Regra dos 5* (Ro5) para a biodisponibilidade oral, a qual prevê que uma baixa absorção ou permeação é mais provável quando o composto apresenta mais de 5 doadores e/ou 10 aceptadores de ligações de hidrogênio, peso molecular maior que 500 Da e $\log P$ maior que 5.³²

Após o trabalho de Lipinski, várias outras análises foram feitas selecionando-se e comparando-se conjuntos de fármacos e não-fármacos publicados na literatura. Por exemplo, Veber *et al.*⁵⁰ propuseram que o número de ligações com rotação livre (≤ 10) e a área superficial polar ($< 140 \text{ \AA}^2$) são duas propriedades importantes para a biodisponibilidade oral em ratos.

À medida que vários conceitos de similaridade com fármacos ganharam aceitação, estes foram incorporados dentro de muitas áreas de descoberta de fármacos. Posteriormente, um refinamento do conceito foi apresentado por Teague *et al.*⁵¹ como resultado da análise de vários pares composto-líder vs fármaco final. Com base neste conjunto de dados eles observaram que os fármacos são sempre mais complexos que os compostos-líderes que os originam. Por exemplo, o peso molecular e $\log P$, bem como o número de aceptadores e doadores de ligação de hidrogênio frequentemente aumentam quando se evolui de um composto-líder a um fármaco.⁴⁵

Existem muitas explicações possíveis para estas observações. Os ligantes obtidos por HTS são frequentemente menos potentes do que os fármacos devem ser, e o aumento da potência é na maioria das vezes mais facilmente alcançado adicionando-se grupos funcionais. Isto, por sua vez, aumenta o peso molecular, juntamente com o número de doadores e aceptadores de ligação de hidrogênio. Assim, os químicos medicinais tendem a adicionar massa a um composto na busca por potência ou seletividade, por exemplo. O $\log P$ segue a mesma tendência uma vez que está correlacionado com o número de átomos de carbono presentes em uma molécula.

Outros tipos de filtros *in silico* têm sido propostos e implementados em programas tais como o Filter, para o planejamento de coleções focadas.^{52,53} Alguns destes são voltados para compostos que contêm grupos funcionais reativos ou indesejáveis, tais como aceitadores de Michael, haletos de alquila, aldeídos ou agregadores. Outro tipo de filtro faz uso de propriedades facilmente calculadas, para pontuar ou classificar moléculas de acordo com seus graus de similaridade com fármacos.⁵⁴

O programa Filter é capaz de calcular diversas propriedades físico-químicas tais como MW, *Log P*, PSA, solubilidade em água, e utilizá-las como base para a seleção ou remoção de estruturas contidas em grandes coleções de estruturas moleculares, com base em limites pré-estabelecidos pelo operador. Além disso, este programa também possui um algoritmo que faz uso da representação estrutural de pequenas moléculas chamada SMARTS (do inglês, *Smiles ARbitrary Target Specification*), que é uma linguagem para especificação de padrões subestruturais em moléculas, para eliminar ou recuperar estruturas cujo padrão SMARTS combina com a referência previamente estabelecida pelo usuário.

Por exemplo, é possível recuperar ou remover da coleção qualquer composto que contenha um grupo fenol com a hidroxila nas posições *orto* ou *para*, como mostra o exemplo da Figura 5.9. Assim todas as moléculas contendo aquele padrão estrutural serão recuperadas ou eliminadas da coleção de compostos, conforme especificação pelo usuário.

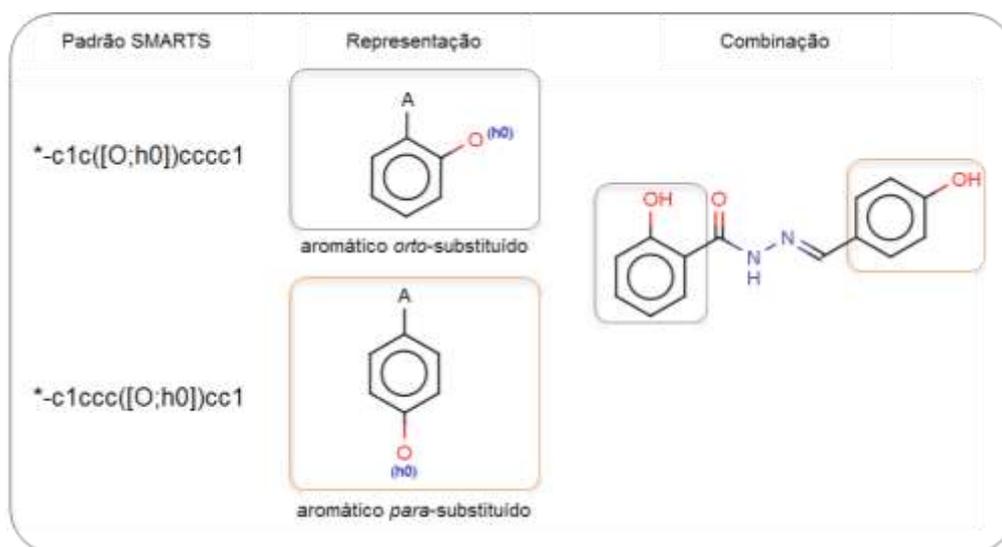


Figura 5.9 - Representação do uso da linguagem SMARTS implementada no programa Filter: “*” representa o padrão “qualquer átomo exceto hidrogênio”; “h0” representa “somente um átomo de hidrogênio”

A partir do uso da linguagem SMARTS, juntamente com a predição de outras propriedades moleculares implementadas no programa Filter, é possível então construir coleções de compostos planejadas para conter apenas aquelas moléculas que possuem propriedades e características estruturais desejadas.

Baseado nessas ideias, o banco de dados selecionado neste trabalho foi submetido a vários filtros de seleção. Além da aplicação dos filtros propostos por Lipinski e Veber, essa seleção foi planejada com o objetivo de delimitar o espaço-químico para que este contivesse somente aqueles compostos com características estruturais e propriedades farmacocinéticas similares a compostos-líderes. Assim, os compostos posteriormente identificados como inibidores seriam passíveis de otimização molecular e possuiriam maiores chances de adquirirem perfis fármaco-similares depois de otimizados. Uma vantagem adicional da aplicação dos filtros moleculares é a redução do banco inicial de moléculas, o que torna a coleção de compostos mais facilmente tratável em estudos de SBVS.

Após o processo de filtragem a subcoleção remanescente continha aproximadamente 450.000 estruturas moleculares. Entretanto, o número total de compostos não é igual ao número total de estruturas contidas no banco, pois existem moléculas representadas em diferentes estados de protonação e formas tautoméricas. Os gráficos da Figura 5.10 mostram as distribuições de algumas propriedades utilizadas como filtros para estruturação da coleção de compostos a ser avaliada através dos estudos de SBVS. Podemos observar nos gráficos da Figura 5.10 que houve uma diminuição significativa da quantidade de compostos devido a aplicação dos filtros.

A mediana dos pesos moleculares após a filtragem se deslocou de 400-450 para 300-350 Da. o que caracteriza uma coleção de compostos com pesos moleculares mais apropriadas para otimização molecular. O mesmo comportamento é observado para as distribuições do número de átomos aceitadores de ligação de hidrogênio (Figura 5.10 (a)), do número de rotações livres (Figura 5.10 (e)) e do logaritmo do coeficiente de partição octanol/água ($X/\log P$, Figura 5.10 (f)). Por outro lado, as distribuições do número de átomos doadores de ligações de hidrogênio (Figura 5.10 (c)) e das áreas superficiais polares (PSA, Figura 5.10 (d)) se mantiveram praticamente as mesmas. Em geral os bancos de dados de compostos comercialmente disponíveis tem uma tendência de possuírem moléculas não muito

complexas, como evidenciado pelos gráficos mostrados na Figura 5.10. Isto se deve ao fato destes compostos não possuírem acessibilidade sintética simples e, provavelmente, a maioria dos compostos complexos que constituem tais bancos de dados tem origem em produtos naturais.

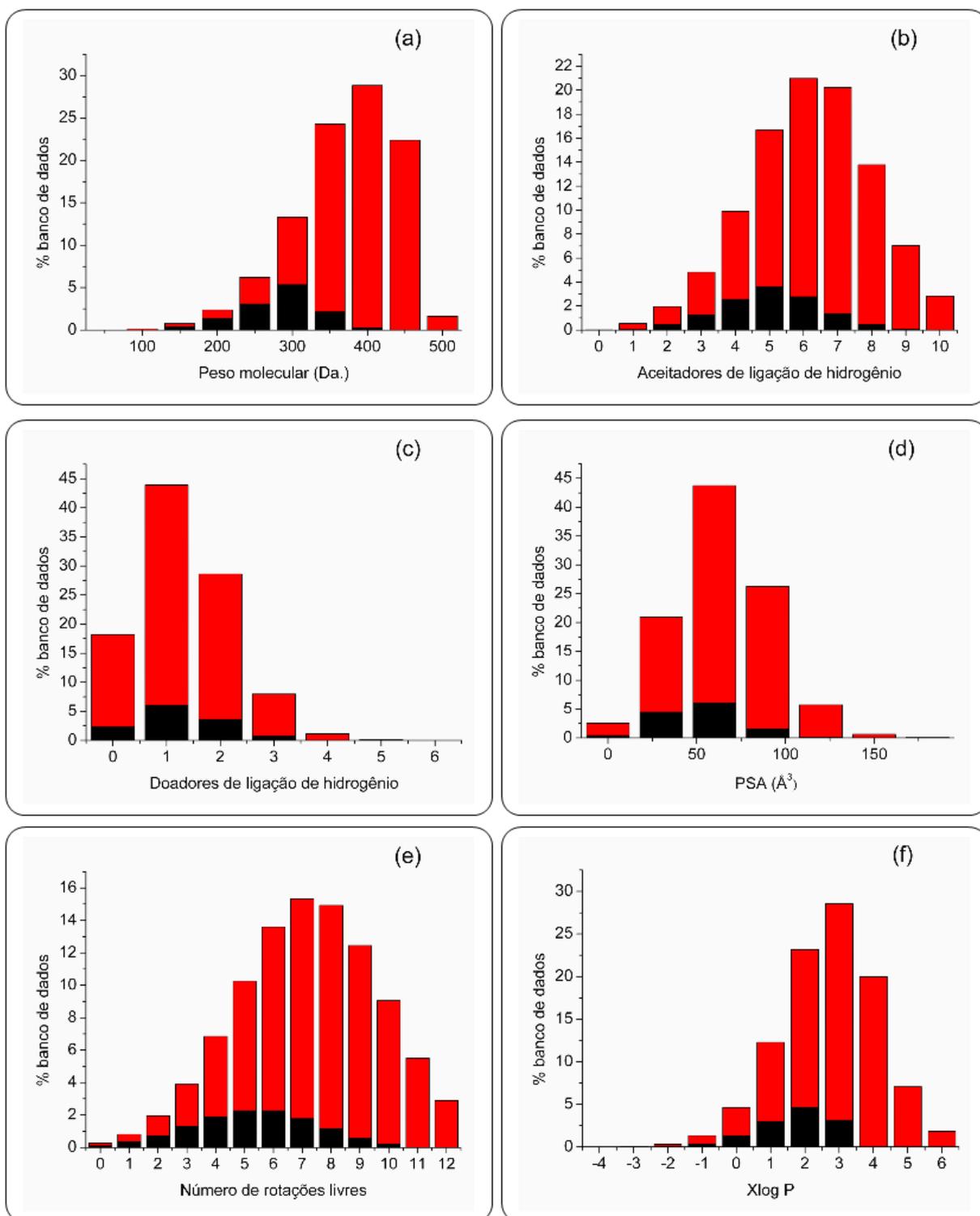


Figura 5.10 - Distribuições de algumas das propriedades antes (vermelho) e após (preto) a filtragem utilizando-se o programa Filter

Mesmo com a enorme quantidade de compostos disponíveis pode-se notar que uma fração consideravelmente pequena faz parte do espaço-químico delimitado por moléculas similares a compostos-líderes ou então que possuem propriedades físico-químicas suficientemente boas para sobreviver aos primeiros ensaios. Este fato evidencia a necessidade da aplicação dos filtros já nas primeiras etapas da seleção de compostos para obtenção de coleções enriquecidas.

Uma vez estabelecida a coleção virtual de compostos esta foi submetida aos pré-tratamentos necessários para cada etapa de docagem molecular no sítio da enzima TcGAPDH.

5.2.4. Docagem consensual

Os resultados obtidos em estudos de SBVS podem variar amplamente dependendo do programa utilizado e das características do sítio explorado. Parte deste problema é causado devido aos diferentes tipos de aproximações utilizadas nas funções de pontuação para descrever o fenômeno de interação molecular (discutido na seção 1.1.4.1). Como nenhuma função de pontuação é perfeita, algumas abordagens têm sido propostas para balancear os erros causados pelas diferentes funções no processo de pontuação dos compostos sendo avaliados. Uma dessas estratégias é chamada de *pontuação consensual* (do inglês, *consensus scoring*) e envolve a pontuação dos compostos contidos numa coleção utilizando-se uma função de pontuação primária, seguida de uma nova avaliação da melhor configuração (orientação/conformação) com outras funções de pontuação. As poses são então escolhidas com base no consenso das pontuações obtidas pelas diferentes funções e isto reduz o efeito causado pelas deficiências intrínsecas de cada função e ajuda na redução do número de falsos-positivos selecionados a partir de SBVS.⁵⁵⁻⁵⁸

O sucesso da pontuação consensual tem sido descrito em vários trabalhos onde o seu uso é geralmente superior quando comparado com o uso de uma única função de pontuação. Contudo, as opiniões são divergentes e deve ser ressaltado que a maioria dos estudos usando a pontuação consensual é realizada com diferentes funções de pontuação, mas apenas um método de docagem (algoritmo de busca). Se um composto é posicionado erroneamente no sítio do receptor, várias funções de pontuação serão aplicadas no mesmo ligante orientado

inadequadamente. Já é conhecido que nenhum método de docagem/pontuação atual fornece resultados satisfatórios para todos os alvos. Na verdade, deve-se fazer um estudo prévio para escolher qual é o melhor programa de docagem para um alvo específico. Além disso, a utilidade da pontuação consensual pode ser limitada se os termos nas diferentes funções de pontuação são significativamente correlacionados, o que poderia ampliar os erros.

Uma alternativa que tem sido proposta é a utilização da *docagem consensual* (*consensus docking*).⁵⁹ Nessa abordagem vários métodos diferentes de docagem são usados, seguidos pela pontuação de cada conjunto independentemente, e no final uma lista com a pontuação combinada para cada composto é produzida. Desse modo, os compostos mais bem pontuados serão aqueles que apresentarem uma boa pontuação em vários programas de docagem diferentes. Na prática, essa estratégia tem vantagens e desvantagens. A desvantagem poderia ser a perda de possíveis compostos ativos caso fossem pobremente docados por um dos softwares mesmo sendo corretamente docados por outro programa. A vantagem de tal abordagem é a realização de uma docagem mais consistente, menos dependente do sítio ativo e com possível redução de falsos-positivos, os quais são menos prováveis de serem bem pontuados em relação aos compostos ativos por dois ou mais programas de docagem.⁵⁹ Num trabalho recente, Moro *et al.* identificaram o ácido elágico como sendo um potente inibidor ($K_i = 20$ nM) da enzima Caseína cinase 2 (CK2) usando a estratégia de docagem consensual partindo de uma coleção contendo apenas 2000 compostos.⁶⁰

A maioria dos inibidores atualmente conhecidos da GAPDH de *T. cruzi* não é apropriada para ser usada na pontuação consensual. Isso porque o mecanismo de inibição desses compostos não é conhecido, já que apenas os valores de IC_{50} foram determinados. Outra estratégia que poderia ser adotada seria a escolha da função de pontuação ou do método de docagem através de curvas ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic curve*), que tem se tornado o método padrão não só para escolha do melhor combinação *função de pontuação/ algoritmo de busca* a ser usada no SBVS, mas também na seleção de hipóteses farmacofóricas ou métricas de similaridade mais adequadas em estudos de LBVS.⁶¹ A aplicação desta estratégia consiste em semear compostos conhecidamente ativos em meio a compostos conhecidamente inativos e avaliar através de métodos estatísticos qual

melhor configuração é capaz de pontuar os compostos ativos nas primeiras posições. Entretanto, uma vez que a principal vantagem desta abordagem é a validação do método através da identificação de ligantes em meio a várias “iscas”, é necessário o conhecimento do mecanismo de inibição bem como da existência de ligantes que apresentem alta afinidade pelo alvo enzimático. De outra forma, sua utilização está sujeita ao enriquecimento artificial da coleção de compostos para ensaios *in vitro* e conseqüentemente à escolha de compostos inativos. Com base nestas considerações, optou-se pela utilização da abordagem de docagem consensual.

Uma maneira de se tirar maior vantagem da estratégia de docagem consensual é a utilização de programas com algoritmos de busca e funções de pontuação que tratam diferentemente fenômenos envolvidos no processo de interação molecular, mas que ao mesmo tempo sejam capazes de alcançar soluções comparáveis e complementares. A partir da realização de uma série de testes utilizando-se vários programas de docagem molecular, Miteva *et al*⁵⁹ sugeriram o uso em conjunto dos programas Fred e FlexX para triagem inicial de coleções virtuais de compostos.

Neste trabalho, os programas de docagem Fred e FlexX foram utilizados conjuntamente para a aplicação da estratégia de docagem consensual não só pelo fato de possuírem características complementares, mas também pela rapidez no processo de docagem de extensas coleções virtuais de compostos; tal como, a subcoleção contendo os 450 mil compostos, obtida na primeira etapa deste trabalho.

O algoritmo de busca implementado no programa FlexX baseia-se no conceito de construção incremental. Na docagem através desta abordagem, primeiro o ligante é decomposto ao longo de suas ligações simples dando origem a fragmentos moleculares. Em seguida os grupos funcionais são posicionados, um a um, independentemente do restante da molécula. Por último a molécula é reconstruída parte por parte levando-se em conta os graus de liberdade rotacionais. A vantagem desta técnica é que a busca conformacional pode ser restrita somente a conformações que se ajustam no sítio de interesse (preenchendo a região de acordo com a forma da cavidade), sendo assim bastante determinístico e preservando a vantagem em termos de rapidez sobre os métodos estocásticos.

Para pontuar as poses encontradas, o FlexX conta com uma função de pontuação empírica que é uma extensão da função de pontuação de Böhm (implementada no programa LUDI). Esta foi calibrada pelo ajuste da constante de afinidade de 45 complexos ligante-proteína e se mostrou capaz de reproduzir as constantes de afinidade deste conjunto de moléculas com um desvio padrão de 1,9 Kcal mol⁻¹.⁶²

O segundo programa utilizado para a docagem consensual, Fred, considera tanto o ligante quanto os receptores rígidos durante a docagem. A varredura do espaço conformacional, geralmente feita através do programa Omega, distribuído pelo mesmo desenvolvedor, que gera um banco de dados de confôrmeros dos compostos a serem docados de acordo com parâmetros estabelecidos pelo usuário. Os mais importantes são: número máximo de confôrmeros por molécula, janela de energia coberta pelos confôrmeros e RMSD mínimo entre os confôrmeros no arquivo de saída. Estes três parâmetros devem ser ajustados de acordo com a distribuição do número de rotações livres dos compostos contidos na coleção para que se obtenha uma representação do espaço conformacional adequada de cada composto. Por exemplo, analisando o gráfico da Figura 5.10 (e) podemos observar que a mediana do número de rotações livres dos compostos situa-se por volta 5. Se cada combinação das variações em 1 grau de cada ângulo diedro livre originar um confôrmero seria impossível avaliar uma coleção contendo milhares de compostos em um tempo hábil; por isso, o RMSD entre as coordenadas cartesianas deve ser usado para a exclusão de confôrmeros muito parecidos e deste modo evitar redundância desnecessária. A janela de energia serve para excluir do banco de confôrmeros aquelas conformações com energias muito distantes do mínimo, uma vez que mesmo que o composto seja capaz de interagir com o alvo nestas conformações o prejuízo energético leva a baixas afinidades. Já o número máximo de confôrmeros deve ser utilizado para estabelecer uma coleção de compostos tratável do ponto de vista do custo computacional. Um fato que dever ser observado é que à medida que o valor da mediana da distribuição do número de graus de liberdade aumenta deve-se aumentar a janela de energia e o RMSD para se obter representatividade conformacional mantendo-se o número máximo de confôrmeros. O inverso é válido à medida que o valor da mediana decresce.

Uma vez fornecido o banco de dados contendo os confôrmeros a serem docados e a estrutura da macromolécula com a região do alvo previamente estabelecida, a docagem é realizada em uma etapa de ajuste e outra de otimização do ligante. Na primeira etapa, o ligante é colocado numa grade de potencial gaussiano com resolução de 0,5 Å que engloba todos os átomos do sítio ativo da região selecionada. Em seguida uma série de três otimizações é processada: (1) refinamento da posição de átomos de hidrogênios de hidroxilas do ligante, (2) otimização do corpo rígido e (3) otimização da pose do ligante com relação ao ângulo diedro no espaço. Para a etapa de otimização quatro funções de pontuação são disponíveis: ShapeGauss, ChemScore, PLP e ChemScore para os três filtros de otimização.⁶

Antes de prosseguir para etapa de docagem da coleção de compostos, ambos os programas Fred e FlexX foram utilizados para a redocagem da molécula S70 no sítio ativo da TcGAPDH. Este passo foi realizado para verificar a eventual necessidade de recalibração dos parâmetros dos programas até que fossem capazes de reproduzir a pose cristalográfica com RMSD inferior a 2 Å, valor limite para se assumir uma boa consistência dos parâmetros para os ensaio virtual.

Os resultados da redocagem mostraram que ambos os programas foram capazes de reproduzir a pose adotada pela molécula S70 na estrutura 1QXS com RMSD iguais a 0,8 e 0,5 Å e energias de interação iguais a -19,8 e -32,3 Kcal mol⁻¹ para o FlexX e para o Fred, respectivamente. A Figura 5.11 mostra a sobreposição de ambos os resultados nos sítio ativo da enzima.

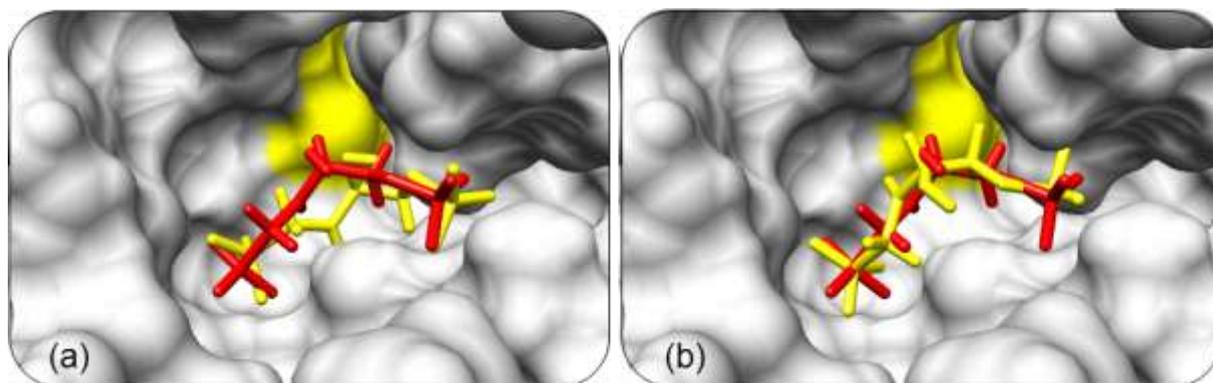


Figura 5.11 - Sobreposição da pose adotada pela molécula S70 (vermelho) na estrutura cristalográfica com as poses obtidas através da redocagem (amarelo) utilizando-se os programas (a) FlexX e (b) Fred.

Podemos observar na Figura 5.11 que ambas as conformações e poses obtidas através da docagem são bastante semelhantes com a estrutura da pose cristalográfica. Isto evidencia que os parâmetros utilizados são consistentes para a busca de novas moléculas capazes de interagir com a mesma região da enzima.

Uma vez validados os parâmetros do FlexX e do Fred através da reprodução da pose cristalográfica, realizou-se a docagem da coleção virtual com as mesmas configurações em ambos os programas e os valores das energias obtidos foram analisados através de análise consensual.

Como discutido na seção 1.1.4.1 as funções de pontuação estimam um valor de energia de interação dos ligantes com o alvo de acordo com a complementaridade entre os mesmos. O tipo de energia estimado depende de cada função de pontuação, por exemplo, ΔG_{int} ou ΔH_{int} . Deste modo, estes valores não são diretamente comparáveis para que seja possível o tratamento consensual, tornando necessário escalar os valores para que estes possuam a mesma ordem de magnitude e a soma tenha significado.

O tipo de tratamento das energias escolhido para a aplicação da análise foi o *autoescalamento*.⁶³ Nesse método as energias de docagem (pontuação) são autoescaladas para valores entre 0 e 1 utilizando-se a Equação 5.1. Quando se escalonam as energias, todos os valores, independentemente do parâmetro utilizado pela função, ficam localizados dentro de um intervalo que vai de 0 (para o composto pior pontuado) a 1 (para o composto melhor pontuado). Deste modo os valores podem ser somados e dar origem ao valor consensual. A Figura 5.12 ilustra este procedimento na prática.

Composto	E (Programa I)	E (Programa II)		Composto	E (Programa I)	E (Programa II)	Consensus
A	-28,40	-95,8	autoescalamento	A	0,57	0,41	0,98
B	-35,10	-60,8		B	1,00	0,06	1,06
D	-19,60	-90,3		D	0,00	0,36	0,36
E	-30,50	-153,5		E	0,70	1,00	1,70
F	-25,90	-126,4		F	0,41	0,72	1,13
H	-24,20	-55,4		G	0,30	0,00	0,30

Figura 5.12 - Processo de autoescalamento das energias obtidas através de funções de pontuação de diferentes programas para a análise consensual.

Devido à grande quantidade de compostos docados, é inviável se fazer inspeção visual nesta etapa da seleção. De fato, a docagem de extensas coleções

virtuais de compostos tem mais o caráter de um filtro molecular para exclusão de moléculas com muito pouca ou nenhuma complementaridade com o sítio da enzima.

Após a docagem, as energias calculadas pela função de pontuação de cada programa foram autoescaladas e somadas aos pares para a seleção dos compostos que iriam constituir a nova coleção a ser subseqüentemente avaliada através do programa Autodock. Arbitrariamente estabeleceu-se um valor de corte para o consenso igual a 1,20. Todos os compostos com pontuação consensual inferior a este corte limite foram descartados, originando uma nova coleção composta por 10000 estruturas que seriam utilizadas na etapa posterior do trabalho.

5.2.5. Seleção dos compostos e ligantes identificados

A última etapa para a seleção das moléculas a serem testadas *in vitro* contra a enzima TcGAPDH foi realizada através da análise visual das poses, energias preditas, e perfis dos grupamentos das soluções encontradas a partir da docagem com o programa Autodock. A escolha deste programa para esta etapa do trabalho deve-se ao seu ótimo desempenho na reprodução de poses e conformações bioativas.

O algoritmo implementado no programa Autodock combina grades de potencial pré-calculadas e uma função de pontuação que contém termos baseados em campo força, ponderados por termos empíricos para estimar a energia livre de interação (ΔG_{int}) com bastante rapidez. Para predizer as poses adotadas pelo ligante com a proteína o programa disponibiliza uma variedade de algoritmos de busca. Desde a versão 3.0 estão disponíveis quatro algoritmos de busca: *Monte Carlo Simulated Annealing*; *Algoritmo Genético* e *Algoritmo Genético Lamarkiano* (global e local). A comparação entre esses métodos de busca mostrou a superioridade do *Algoritmo Genético Lamarkiano* quando o número de graus de liberdade do sistema aumenta, e por esse motivo foi utilizado na docagem da coleção de compostos.¹⁰

A docagem do ligante S70 utilizando-se os parâmetros escolhidos mostrou-se capaz de reproduzir a pose cristalográfica com RMSD de 0,3 Å e ΔG_{int} igual a -3,29 Kcal mol⁻¹, bastante próximo ao valor experimental que é de -3,68 Kcal mol⁻¹. Então, na etapa subseqüente foi efetuada a docagem da coleção virtual obtida a partir da análise consensual.

Para reduzir o número de moléculas após o processo de docagem cujas análises das soluções seriam feitas, decidiu-se priorizar os compostos com ΔG_{int} preditos menores que $-6,20 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Apesar de arbitrário, a escolha deste valor se baseia no baixo desvio entre o valor de ΔG_{int} predito e o valor real para o composto S70. Deste modo, idealmente o valor de corte escolhido corresponde a uma constante de afinidade igual a $28 \mu\text{M}$. A redocagem da Chalepina não seria possível neste caso, pois além de a estrutura a qual ela está complexada (1K3T) não possuir o cofator, a pose adotada na interação desta molécula com o sítio ativo da enzima é estabilizada por ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água, tornando o processo de redocagem na estrutura 1QXS inconsistente.

Após a aplicação deste corte o número de ligantes a ser analisado caiu para 2000. Em seguida as 100 poses obtidas para cada um dos ligantes mais bem pontuados foram agrupadas com base no desvio quadrático médio entre as coordenadas cartesianas (RMSD) para cada par de soluções. Foi estabelecido que, para fazer parte de um mesmo grupamento de poses, o RMSD entre os membros do grupamento não poderia exceder 2 \AA . Em seguida o número de poses constituindo cada grupamento foi traçado em função dos valores ΔG_{int} calculados pela função de pontuação. Esta análise resultou em um gráfico de barras para cada ligante como os mostrados na Figura 5.13.

Os gráficos de agrupamentos das Figura 5.13 (a) e (b) referem-se a dois compostos com perfis de interação molecular com a enzima TcGAPDH bastante distintos. No primeiro, observa-se um grande agrupamento de poses próximo aos valores mais negativos de energia de Gibbs e apenas poucas soluções distribuídas ao longo do restante da faixa de energia coberta pelos outros grupamentos. Isto significa que, em uma série de avaliações feitas pelo programa, as poses de menor energia adotadas pelo ligante dentro do sítio não possuem um RMSD entre as coordenadas cartesianas dos átomos maior que 2 \AA . Qualitativamente, desvios de até 2 \AA podem ser considerados a mesma estrutura e, deste modo, este tipo de ligante tem boas chances de realmente adotar tal pose num sistema real e de sua energia de interação ser bastante favorável, como predito pela função de pontuação. Este perfil é exatamente o desejado no momento da escolha das moléculas a serem posteriormente testadas *in vitro*.

No gráfico da Figura 5.13 (b) percebemos uma distribuição muito mais ampla dos grupamentos. Isto significa que o processo de reconhecimento molecular do ligante pelo sítio não é específico suficientemente para permitir que tal molécula interaja preferencialmente apenas com um determinado conjunto de resíduos de aminoácidos levando as inúmeras soluções com discrepâncias bastante significativas em relação às poses adotadas e às energias correspondentes. Este é exatamente o perfil de interação molecular o qual se deve evitar no momento da seleção de compostos para testes contra o alvo. Moléculas com perfis de interações inespecíficas como esta possuem poucas chances de inibirem o alvo ou mesmo de serem ativas.

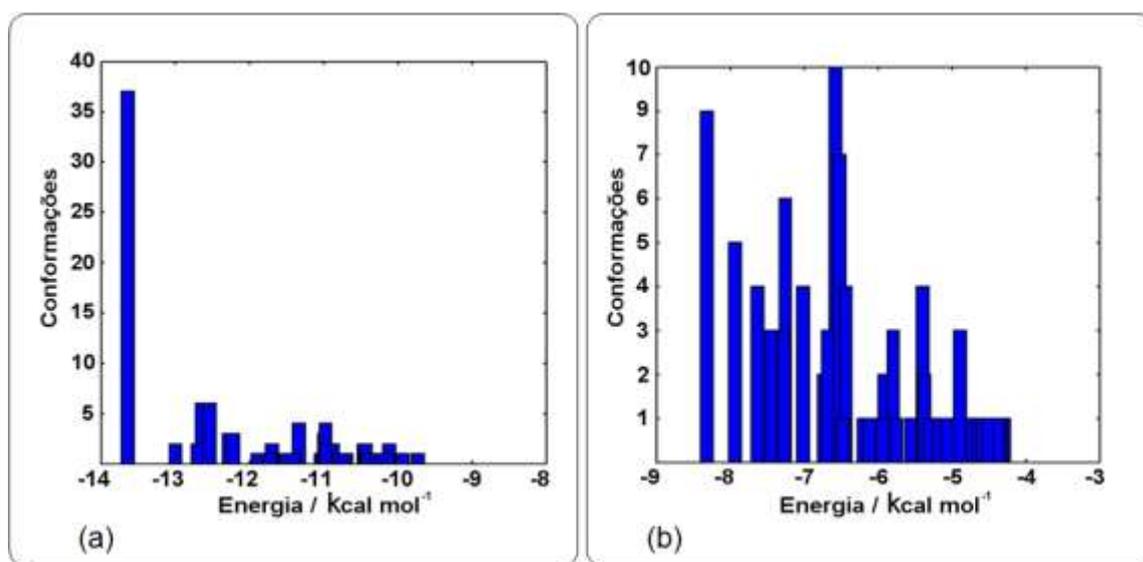


Figura 5.13 - Perfis de agrupamentos (a) desejados e (b) indesejados de interações moleculares

A inspeção visual das poses adotadas pelas moléculas, combinada com os gráficos de agrupamentos, representam a etapa essencial na escolha dos compostos que serão testados *in vitro*. Como segundo critério de prioridade foi adotado a seleção dos compostos cujos perfis de interação os caracterizavam como ligantes mais promissores. Ao final, apenas 60 moléculas foram selecionadas para inspeção visual mais minuciosa das poses. A escolha de um conjunto a ser testado nessa etapa é um tanto quanto subjetiva, pois segundo os parâmetros de análise todas as moléculas possuem características bastante similares.

A inspeção visual dos complexos preditos pela docagem foi feita levando-se em conta os seguintes fatores: complementaridade com o sítio, número de ligações de hidrogênio, consistência da conformação adotada, e resíduos com os quais as moléculas interagem. O conjunto de moléculas selecionado continha diversos

membros substituídos pelo o grupo diaminotriazina (Figura 5.14) posicionando-se sempre da mesma forma para interação com os resíduos Asp210, Thr235 e Ser224 do sítio; preenchendo eficientemente a cavidade ocupada pela molécula S70, e com energias de interação bastante favoráveis em relação às demais moléculas que não continham este grupo como parte da estrutura.

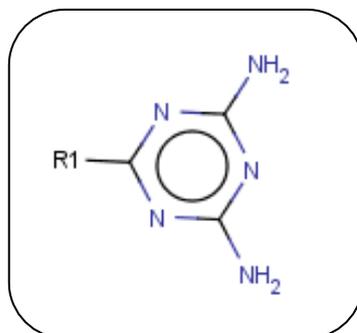


Figura 5.14 - Estrutura molecular do grupo diaminotriazina.

Compostos pertencentes à classe com substituintes diaminotriazina têm sido identificados como inibidores de alvos enzimáticos presentes em parasitos, tais como a Dihidrofolato redutase (DHFR) do *P. falsiparum* e Tripanotiona redutase (TR) do *T. cruzi*.

Na primeira coluna da Figura 5.15 (a.1. e b.1) são mostradas as estruturas moleculares de dois compostos selecionados para teste *in vitro* que, segundo os critérios de análise, possuem interações favoráveis com resíduos do sítio de interação explorado durante o SBVS. As colunas que seguem (a.2, a.3 e b.2, b.3) mostram a estrutura do complexo desses compostos com a TcGAPDH predita através da docagem molecular representadas de forma distintas para facilitar a análise da pose e complementaridade em termos da forma com o sítio. Podemos perceber que os dois compostos (varetas azuis) ocupam a mesma região que a molécula S70 (em varetas vermelhas) na estrutura cristalográfica, obstruindo o acesso à Cisteína catalítica (superfície amarela mais ao fundo). Entretanto, a molécula (b), que contém o fragmento diaminotriazina, é capaz de se estender desde o sítio até uma região mais externa em direção aos resíduos importantes para seletividade entre a TcGAPDH e a HsGAPDH (Asp210 e Ser224) e também a Thr325. De fato, isso ocorre devido à exposição dos resíduos Asp210 (carregado negativamente), Thr325 e Ser224 (aceitadores de ligação de hidrogênio), os quais interagem prontamente com os grupos amina da diaminotriazina através de ligações

de hidrogênio. A molécula (a), por outro lado, se mostra mais complementar apenas com a região ocupada pela molécula S70.

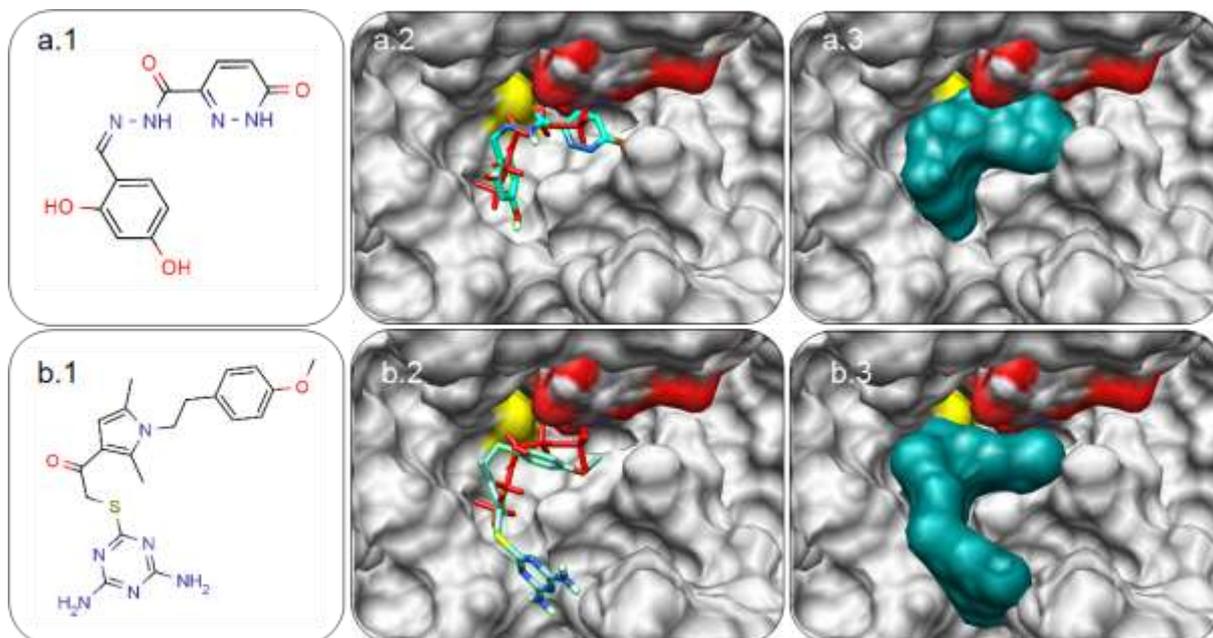
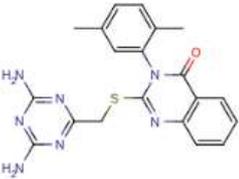
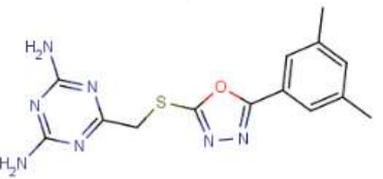
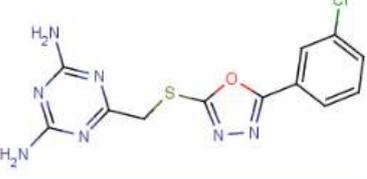
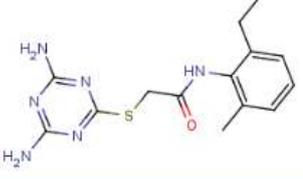
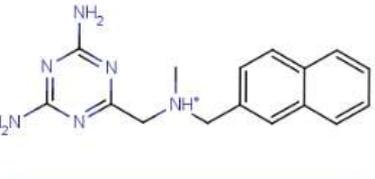
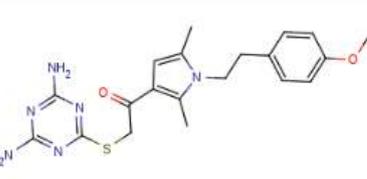
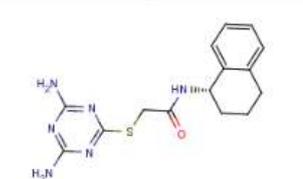
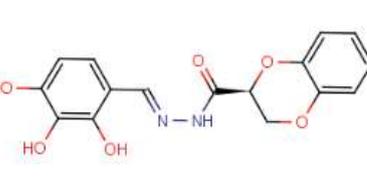
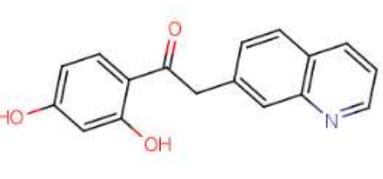
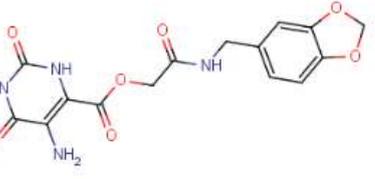


Figura 5.15 – Em a.1 e b.1 são mostradas as estruturas moleculares de dois dos doze compostos selecionados para ensaio contra a TcGAPDH; nas coluna 2 são mostradas as poses adotadas pelos respectivos compostos dentro da cavidade onde se localiza o ligante S70 (em varetas vermelhas) na estrutura 1QXS, representada pela superfície de van der Waals com a região da Cys166 em amarelo e do cofator de acordo com os átomos constituintes. A coluna 3 se distingue da coluna dois apenas pela representação dos ligantes através de suas superfícies van der Waals

Levando-se em conta estes fatores e prezando-se pela diversidade estrutural, foram selecionados mais dez compostos. Estes foram adquiridos comercialmente e testados *in vitro* contra a enzima TcGAPDH conforme as condições descritas na seção 5.1. As estruturas dos doze compostos avaliados através dos ensaios enzimáticos juntamente com os respectivos valores de atividade biológica são mostrados na Tabela 5.8.

Podemos observar na Tabela 5.8 que apenas os compostos 7, 10 e 12 apresentaram alguma atividade contra a enzima em concentração igual 100 μM . Dos três, apenas o composto 10 possui IC_{50} inferior a 100 μM . Entretanto, não foi possível a determinação do percentual de inibição dos compostos 8 e 11 utilizando a técnica de espectrofotometria de ultravioleta, uma vez estes compostos absorvem no mesmo comprimento de onda (340 nm) utilizado para monitorar a formação do NADH. Estes tiveram que ser avaliados por ITC juntamente com o composto 10 para determinação das constantes inibitórias.

Tabela 5.8 - Estruturas moleculares e respostas biológicas dos compostos avaliados no teste *in vitro* contra a TcGAPDH

 <p>MW: 405,5 Fórmula: C₂₀H₁₉N₇OS % Inib: 16,83 Ki: -</p>	 <p>MW: 329,4 Fórmula: C₁₄H₁₅N₇OS % Inib: 9,38 Ki: -</p>	 <p>MW: 217,2 Fórmula: C₁₀H₁₁N₅O % Inib: 8,88 Ki: -</p>
 <p>MW: 335,8 Fórmula: C₁₂H₁₀ClN₇OS % Inib: 0,56 Ki: -</p>	 <p>MW: 318,397 Fórmula: C₁₄H₁₅N₅OS % Inib: 18,6 Ki: -</p>	 <p>MW: 295,4 Fórmula: C₁₈H₁₅N₅ % Inib: 10,16 Ki: -</p>
 <p>MW: 412,5 Fórmula: C₂₀H₂₄N₅O₂S % Inib: 24,44 Ki: -</p>	 <p>MW: 274,2 Fórmula: C₁₂H₁₀N₄O₄ % Inib: nd Ki: 11,9 ± 4 μM</p>	 <p>MW: 330,4 Fórmula: C₁₅H₁₅N₅OS % Inib: 1,44 Ki: -</p>
 <p>MW: 330,3 Fórmula: C₁₈H₁₄N₂O₅ % Inib: 65,54 Ki: 71,0 ± 3 μM</p>	 <p>MW: 279,3 Fórmula: C₁₇H₁₃NO₃ % Inib: nd Ki: 35,5 ± 5 μM</p>	 <p>MW: 362,3 Fórmula: C₁₅H₁₄N₄O₇ % Inib: 29,2 Ki: -</p>

nd - não foi possível a determinação utilizando a técnica de espectrofotometria de ultravioleta devido à absorbância no comprimento de onda utilizado para monitorar a formação do NADH (340 nm).

Os ensaios realizados através de ITC revelaram que os compostos 8, 10 e 11 possuem afinidade pela enzima em concentrações inferiores a 80 μM. Uma diferença bem evidente entre os compostos e 8 e 10, dois dos mais potentes encontrados, e todos os demais compostos testados é a presença do grupo semicarbazona. Este grupo faz parte de uma série de fragmentos frequentemente reconhecidos por Cisteínas ativadas e já investigados como inibidores de Cisteína

proteases.⁶⁴ Mesmo sendo uma desidrogenase, a GAPDH compartilha desta característica com as Cisteíno proteases, pois possui como principal resíduo catalítico a Cys166, que de acordo com o mecanismo da reação (vide seção 3.1.1), é a ativada pelo resíduo de His194 para que a catálise ocorra. Na Figura 5.16 são mostrados alguns dos fragmentos mais comumente reconhecidos por este tipo de resíduo.⁶⁵

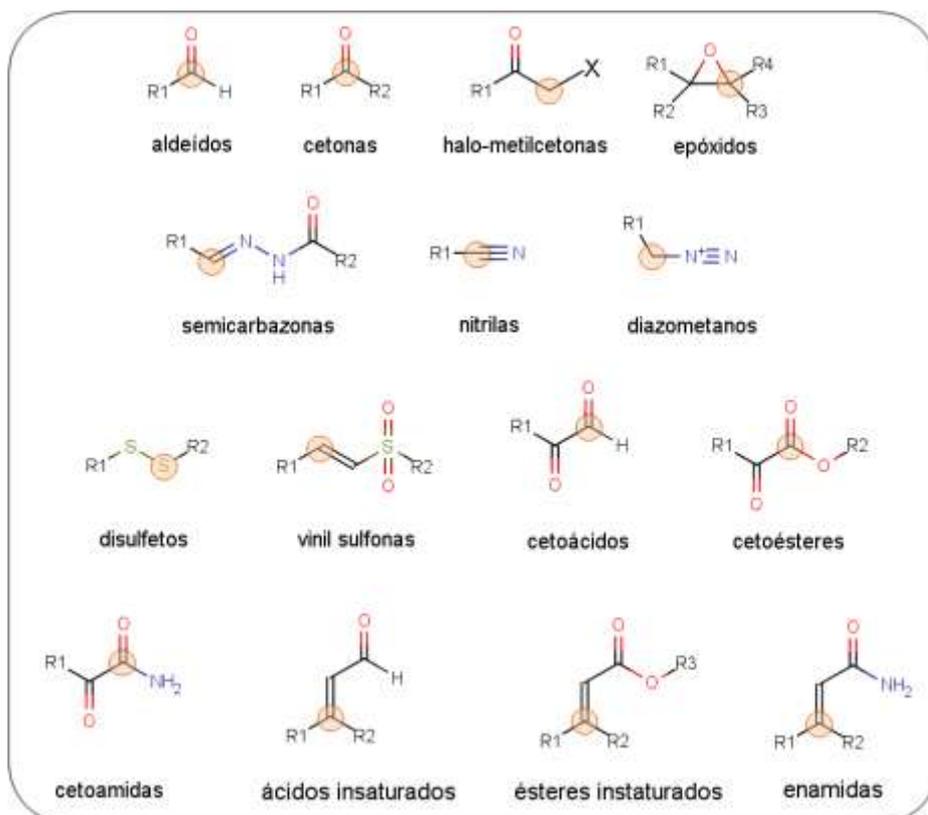


Figura 5.16 - Grupos frequentemente reconhecidos por resíduos de Cisteína ativadas. Os círculos em laranja indicam onde ocorre o ataque nucleofílico por Cisteínas ativadas

Uma análise das interações e poses previstas para o complexo dos compostos 8 e 10 (Figura 5.17 (a) e (b)) mostra que o átomo de carbono sp^2 ligado ao nitrogênio do grupo semicarbazona, o qual usualmente sofre o ataque nucleofílico pela Cisteína, é capaz de se posicionar adequadamente para este tipo de interação com a Cys166. Esta pose é bastante favorecida pela forma curva da cavidade entre os sítios P_s e P_i , que nesse caso são ocupados pelos anéis terminais presentes em ambos os compostos. Pode parecer incomum a ocupação dos sítios de fosfato por dois grupamentos alílicos, entretanto, este posicionamento resulta da substituição de interações eletrostáticas que ocorrem entre os grupos fosfatos e o resíduo Arg249 positivamente carregado, por interações do tipo cátion- π deste mesmo resíduo com

os anéis aromáticos dos ligantes. Este tipo de interação só é observado para os compostos 8, 10 e 11. Para todos os demais compostos da série, os quais contêm o fragmento diaminotriazina, esta pose não é adotada dentro do sítio, uma vez que o heteroanel terminal se estende na direção dos resíduos Asp210 Ser 224 e Thr335, que se localizam numa região mais externa ao sítio catalítico.

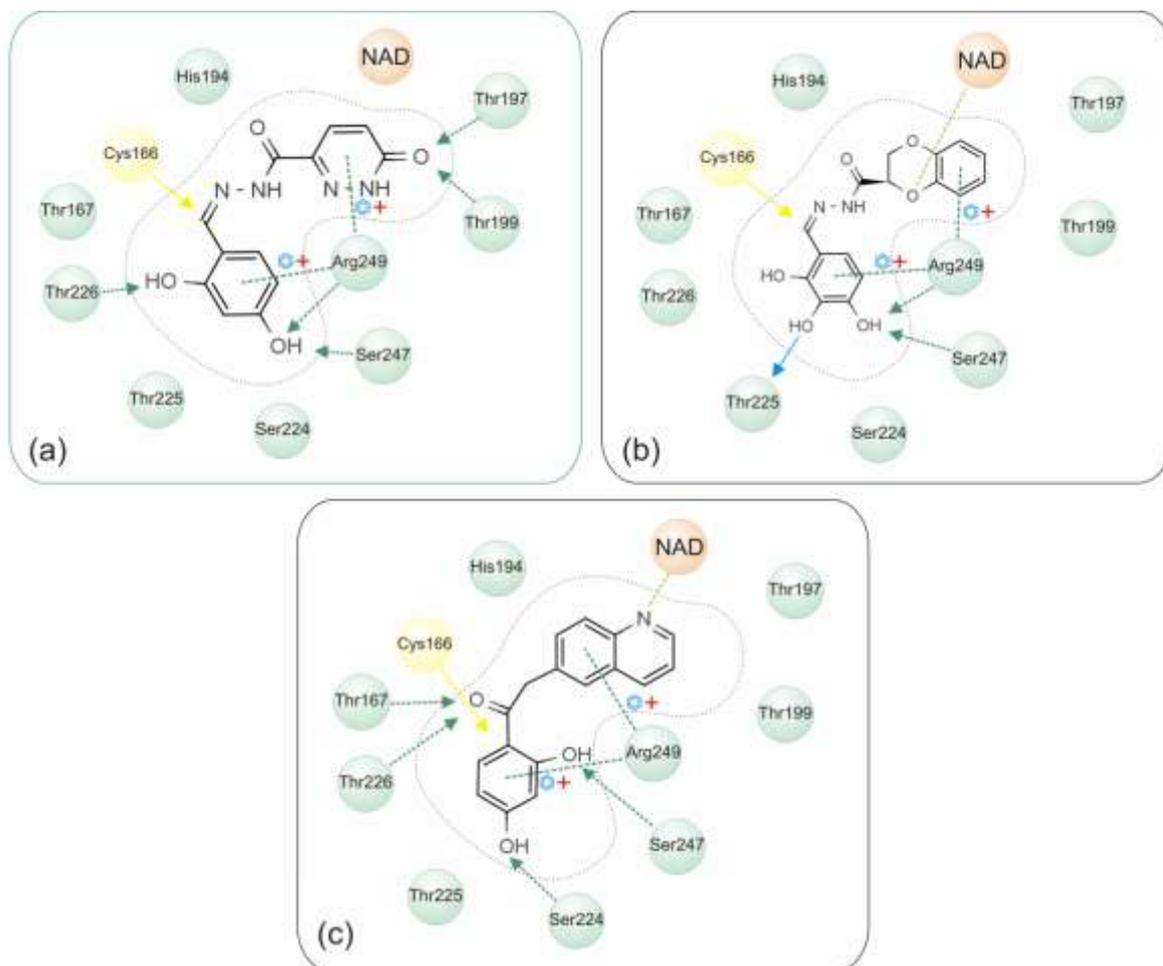


Figura 5.17 - Análise bidimensional das interações previstas para os compostos (a) 8, (b) 10 e (c) 11 com o sítio da TcGAPDH;

O fato de o composto 11 possuir o grupo cetônico como ponte entre os anéis que ocupam os sítios de fosfatos sugere mais uma vez que a afinidade do mesmo também pode estar relacionada à interação com a Cys166. Como observado na Figura 5.17 (c), as mesmas considerações feitas para os compostos 8 e 10, também são válidas para o composto 11. Naturalmente, estas considerações derivam de observações previstas computacionalmente, porém, são fundamentadas numa característica intrínseca do processo de reconhecimento molecular de Cisteínas ativadas. Outro ponto interessante a ser ressaltado diz respeito ao tipo de interação

que pode estar ocorrendo entre os compostos 8, 10 e 11 com a Cys166. Há uma tendência de que os compostos contendo os eletrófilos listados na Figura 5.16 interajam covalentemente com a Cisteínas ativadas. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que este processo pode ser reversível, como por exemplo, a própria formação do intermediário tio-hemiacetal que ocorre durante o mecanismo de catálise. Esta probabilidade de mecanismo é maior para o composto 11, devida similaridade do complexo formado com o estado de transição da reação catalisada pela GAPDH.

Os compostos 8,10 e 11 possuem LE iguais a 0,34, 0,24 e 0,29 Kcal mol⁻¹ átomo⁻¹, respectivamente, e pesos moleculares entre 274 e 330 g mol⁻¹. Portanto, isto significa que ainda podem ser adicionados pelo menos 13 átomos diferentes de hidrogênio para otimização de suas potências até que estes adquiram perfis fármaco-similares e, conseqüentemente, MW limites para biodisponibilidade oral. Isto, associado suas baixas complexidades moleculares os tornam ótimos candidatos à otimização molecular visando a geração de compostos que podem ser usados como agentes tripanocidas.

5.2.6. Proposta de novos inibidores

Com o objetivo de entender melhor o mecanismo pelo qual o composto 11 interage com o sítio da TcGAPDH, foi feita uma busca no banco de dados Emolecules por compostos análogos e comercialmente disponíveis que possibilitassem ter uma visão sobre a influência de cada grupamento contido na molécula para a afinidade pela enzima. Esta busca resultou nos seis compostos mostrados na Figura 5.18.

No composto (a) da Figura 5.18, as duas hidroxilas do anel fenólico do composto 8 são substituídas por metoxilas, esta substituição pode prover informação sobre as interações com os resíduos de Ser247 e Ser224, pois devido à característica anfiprótica dos mesmos, este são capazes tanto de receber quanto aceitar ligações de hidrogênio. No composto (b) estas interações são impossibilitadas, para verificar se as mesmas de fato ocorrem, e o quanto contribuem para a afinidade como um todo.

As interações do grupo semicarbazona terminal, fundida no anel piridazinona, podem ser avaliadas quanto à sua importância através do composto (c), pois a

presença de dois grupos semicarbazona no composto 11 (o mais potente encontrado) sugere, mais uma vez, que este seja relevante para a afinidade observada. Como complemento à avaliação dos compostos (b) e (c), a atividade exibida pelo composto (d) servirá para avaliar o efeito sinérgico dos substituintes terminais.

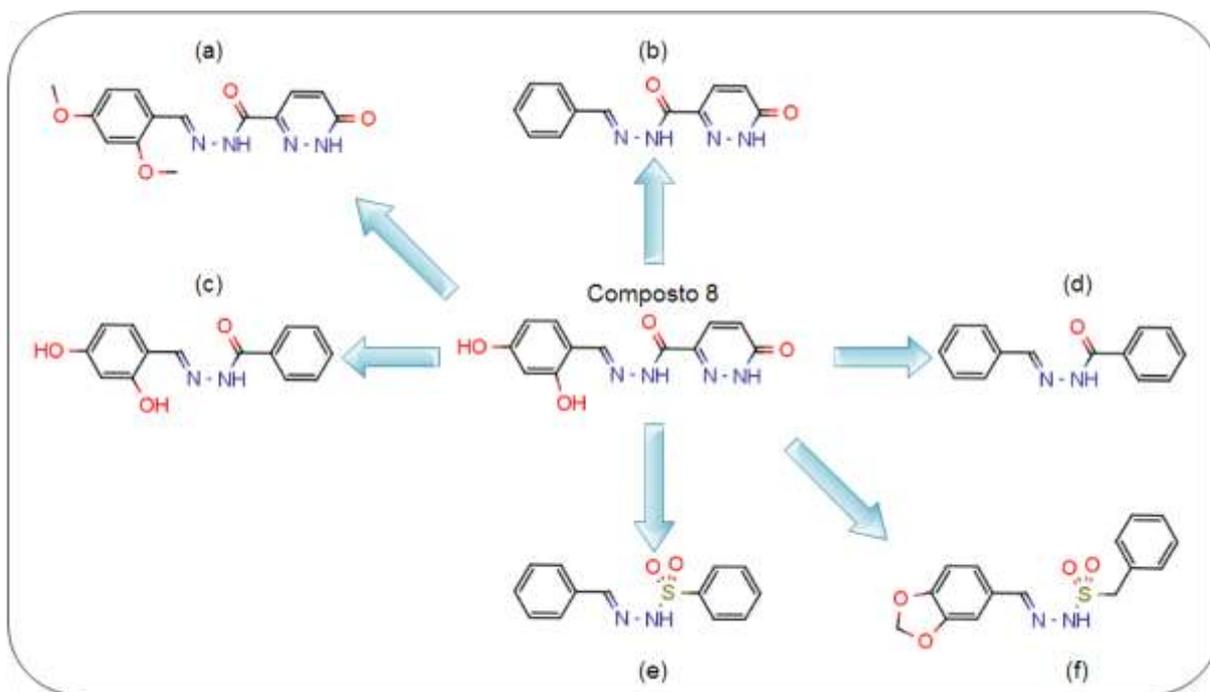


Figura 5.18 - Moléculas análogas ao composto 11 encontrados como resultado da busca no banco de dados Emolecules

A substituição bioisostérica do grupo semicarbazona por tio-semicarbazona nos compostos (e) e (f) é uma estratégia frequentemente utilizada para otimização de compostos bioativos⁶⁶ e, neste caso, pode evidenciar se a atividade da classe é favorecida ou não por esse tipo de substituição.

De fato, as modificações propostas neste trabalho não varrem completamente o espectro de possibilidades de modificações estruturais sistemáticas do esqueleto do composto 8. Entretanto, estas propostas podem trazer informações bastante relevantes para o processo de otimização deste composto, baseando-se apenas em compostos prontamente disponíveis para aquisição comercial, permitindo assim uma análise mais cuidadosa das características estruturais relevantes para o reconhecimento molecular antes que se de início à síntese de análogos.

5.3. Conclusões

A identificação de novos compostos capazes de modular a atividade da enzima TcGAPDH, alvo que desempenha função metabólica importante para a sobrevivência do parasito *T. cruzi*, foi realizada com sucesso neste trabalho através a utilização de métodos em Quiminformática. O estabelecimento das estratégias para a utilização das ferramentas computacionais, em conjunto com as informações estruturais disponíveis para o alvo e perfis estruturais que caracterizam moléculas promissoras como compostos-líderes, tornaram possível a seleção de compostos pertencentes ao espaço químico definido por moléculas com propriedades físico-químicas e ADME preditas que os fazem ótimos candidatos à otimização molecular para que sejam capazes de seguirem na gênese planejada de fármacos. Além disso, a identificação dos compostos ativos valida os critérios e as estratégias adotadas para a priorização dos mesmos em relação aos demais compostos contidos em uma extensa coleção *in silico* de moléculas comercialmente disponíveis.

A potência dos compostos identificados está dentro do esperado para estudos envolvendo planejamento computacional. Entretanto, a Taxa de Acerto, considerando-se apenas os compostos com K_i inferior a 80 μM , que foi de 30%, pode ser considerada bastante superior às usualmente encontradas quando são utilizados ensaios em massa (HTS), que estão por volta de 1/1000. Mais importante que a própria potência dos compostos são as suas Eficiências do Ligante, as quais sugerem a possibilidade de que, após otimizados, os mesmos tenham boas chances de adquirirem propriedades essenciais para permeabilidade e biodisponibilidade oral.

Os resultados encontrados evidenciam que o mecanismo de reconhecimento molecular dos compostos mais potentes pode estar relacionado à interação com os grupos semicarbazona ou cetona presentes nesses compostos, os quais estão comumente presentes em inibidores de enzimas contendo Cisteínas ativadas, como a GAPDH e as Cisteíno proteases. Entretanto, apesar das observações realizadas com base em métodos computacionais sugerirem fortemente que isto provavelmente deve ocorrer, somente através de investigações mais detalhadas do mecanismo de inibição ou acesso a estruturas do complexo entre a GAPDH e estes inibidores poderão validar estas hipóteses.

O teste de uma nova serie de análogos comercialmente disponíveis também foi proposto para verificar o efeito dos diferentes grupamentos, inclusive do grupamento eletrófilo semicarbazona, para o reconhecimento molecular e afinidade exibida pelo composto mais potente identificado. Estas informações serão posteriormente utilizadas para o processo de otimização molecular destes compostos ou dos outros membros ativos da série, principalmente o composto 11, devido à maior probabilidade de estar interagindo de forma covalente reversível.

5.4. Referências

1. BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
2. IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2004.
3. FILTER, version 2.0.2. Santa Fe: OpenEye Scientific Software Inc., 2007. 1 CD-ROM
4. MAESTRO, version 7.5. New York: Schrödinger LCC, 2006. 1 DVD
5. OMEGA, version 2.2.1. Santa Fe: OpenEye Scientific Software Inc., 2007. 1 CD-ROM.
6. FRED, version 2.0.2. Santa Fe: OpenEye Scientific Software Inc., 2007. 1 CD-ROM
7. RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A Fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology*, v. 261, n. 3, p. 470-489, 1996.
8. EDWARDS, P. M. Origin 7.0: Scientific Graphing and Data Analysis Software. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 42, n. 5, p. 1270-1271, 2002.
9. HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 1145-1152, 2007.
10. MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry*, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.
11. AUTODOCKTOOLS, version 1.4.6. La Jola: The Scripps Research Institute, 2007. 1 CD-ROM
12. EMOLECULES: Chemical structure drawing search. Disponível em: <<http://www.emolecules.com>>. Acesso em: 14 jan. 2010.
13. PARALLEL VIRTUAL MACHINE (PVM). Disponível em: <<http://www.csm.ornl.gov/pvm>>. Acesso em: 16 jan. 2010.
14. GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity--a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.
15. USING autodock 4 for virtual screening. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/faqs-help/tutorial/using-autodock4-for-virtual-screening>>. Acesso em: 22 jan. 2010.

16. WIGGERS, H. J.; CHELESKI, J.; ZOTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.; MONTANARI, C. A. Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays. **Analytical Biochemistry**, v. 37, p. 107-114, 2007.
17. SIGMAPLOT, version 10.0.1. San Jose: Systat software inc, 2006. 1 CD=ROM
18. PAVAO, F.; CASTILHO, M.; PUPO, M.; DIAS, R.; CORREA, A.; FERNANDES, J.; DA SILVA, M.; MAFEZOLI, J.; VIEIRA, P.; OLIVA, G. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, n. 1-3, p. 13-17, 2002.
19. MARCHI, A. A.; CASTILHO, M. S.; NASCIMENTO, P. G. B.; ARCHANJO, F. C.; DEL PONTE, G.; OLIVA, G.; PUPO, M. T. New 3-piperonylcoumarins as inhibitors of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gGAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4823-4833, 2004.
20. CASTILHO, M.; PAVAO, F.; OLIVA, G.; LADAME, S.; WILLSON, M.; PERIE, J. Evidence for the two phosphate binding sites of an analogue of the thioacyl intermediate for the *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-catalyzed reaction, from its crystal structure. **Biochemistry**, v. 42, p. 7143 - 7151, 2003.
21. LADAME, S.; CASTILHO, M.; SILVA, C.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; PERIE, J.; OLIVA, G.; WILLSON, M. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 22, p. 4574-4586, 2003.
22. DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; KLEYWEGT, G. J. Application and limitations of x-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 42, n. 24, p. 2718-2736, 2003.
23. BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 472-475, 1992.
24. RUPP B. **Biomolecular crystallography**: principles, practice and application to structural biology. New York: Garland Science, 2009. 800 p.
25. COMPUTED ATLAS SURFACE TOPOGRAPHY OF PROTEINS (CASTp). Disponível em: <<http://sts.bioengr.uic.edu/castp/>>. Acesso em: 22 jan. 2010.
26. ARONOV, A. M.; GELB, M. H. Synthesis and structure-activity relationships of adenosine analogs as inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Modifications at positions 5' And 8. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 24, p. 3505-3510, 1998.
27. ARONOV, A. M.; VERLINDE, C. L. M. J.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Selective tight binding inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 24, p. 4790-4799, 1998.
28. ARONOV, A. M.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; VERLINDE, C. L. M. J.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4273-4278, 1999.
29. BRESSI, J. C.; VERLINDE, C. L. M. J.; ARONOV, A. M.; SHAW, M. L.; SHIN, S. S.; NGUYEN, L. N.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; KUNTZ, I. D.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of trypanosomatidae via structure-based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 13, p. 2080-2093, 2001.

30. KENNEDY, K. J.; BRESSI, J. C.; GELB, M. H. A disubstituted NAD⁺ analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 95-98, 2001.
31. HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.
32. LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.
33. BOND, C. S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v. 7, n. 1, p. 81-89, 1999.
34. KHAN, M. O. F.; AUSTIN, S. E.; CHAN, C.; YIN, H.; MARKS, D.; VAGHJIANI, S. N.; KENDRICK, H.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; DOUGLAS, K. T. Use of an Additional hydrophobic binding site, the Z site, in the rational drug design of a new class of stronger trypanothione reductase inhibitor, quaternary alkylammonium phenothiazines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 16, p. 3148-3156, 2000.
35. MOLECULAR OPERATING ENVIRONMENT (MOE), version 2008.v10. Montreal: Chemical Computing Group, 2008. 1 CD-ROM
36. GOUET, P.; COURCELLE, E.; STUART, D.; METOZ, F. ESPript: Analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.
37. PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
38. SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Letters**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.
39. KENNEDY, T. Managing the drug discovery/development interface. **Drug Discovery Today**, v. 2, n. 10, p. 436-444, 1997.
40. EKINS, S.; BOULANGER, B.; SWAAN, P.; HUPCEY, M. Towards a new age of virtual ADME/TOX and multidimensional drug discovery. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 5, p. 381-401, 2002.
41. HUYNH, L.; MASEREEUW, R.; FRIEDBERG, T.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; MANIVET, P. In silico platform for xenobiotics ADME-T pharmacological properties modeling and prediction. Part I: beyond the reduction of animal model use. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 7-8, p. 401-405, 2009.
42. LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 235-249, 2000.
43. GILLET, V. J.; WILLETT, P.; BRADSHAW, J. Identification of biological activity profiles using substructural analysis and genetic algorithms. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, n. 2, p. 165-179, 1998.
44. SADOWSKI, J.; KUBINYI, H. A scoring scheme for discriminating between drugs and nondrugs. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 18, p. 3325-3329, 1998.
45. OPREA, T. I.; DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; LEESON, P. D. Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 41, n. 5, p. 1308-1315, 2001.

46. BEMIS, G. W.; MURCKO, M. A. The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 15, p. 2887-2893, 1996.
47. MUEGGE, I.; HEALD, S. L.; BRITTELLI, D. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 12, p. 1841-1846, 2001.
48. MCGOVERN, S. L.; CASELLI, E.; GRIGORIEFF, N.; SHOICHET, B. K. A Common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 8, p. 1712-1722, 2002.
49. LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, n. 1, p. 235-249.
50. VEBER, D. F.; JOHNSON, S. R.; CHENG, H.-Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.
51. TEAGUE, S. J.; DAVIS, A. M.; LEESON, P. D.; OPREA, T. The design of leadlike combinatorial libraries. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 1999.
52. RISHTON, G. M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening. *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 2, p. 86-96, 2003.
53. WALTERS, W. P.; MURCKO, M. A. Library Filtering systems and prediction of drug-like properties. In: BOHM H. J.; SCHNEIDER, G. (Eds.). *Virtual Screening for Bioactive Molecules*. Weinheim:Wiley-VCH: 2000. p. 15-32.
54. LEACH, A. R.; GILLET, V. J. Virtual screening. In: LEACH, A. R.; GILLET, V. J. (Eds.). *An introduction to chemoinformatics*. Dordrecht: Springer, 2007. p. 159-182.
55. CHARIFSON, P. S.; CORKERY, J. J.; MURCKO, M. A.; WALTERS, W. P. Consensus scoring: A method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 25, p. 5100-5109, 1999.
56. FEHER, M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 9-10, p. 421-428, 2006.
57. CLARK, R. D.; STRIZHEV, A.; LEONARD, J. M.; BLAKE, J. F.; MATTHEW, J. B. Consensus scoring for ligand/protein interactions. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 20, n. 4, p. 281-295, 2002.
58. XING, L.; HODGKIN, E.; LIU, Q.; SEDLOCK, D. Evaluation and application of multiple scoring functions for a virtual screening experiment. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 18, n. 5, p. 333-344, 2004.
59. MITEVA, M. A.; LEE, W. H.; MONTES, M. O.; BRUNO, O. V. Fast structure-based virtual ligand screening by combining Fred, DOCK and Surflex. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 19, p. 6012-6022, 2005.
60. COZZA, G.; BONVINI, P.; POLLETTA, G.; PAGANO, M. A.; SARNO, S.; DEANNA, A. D.; ZAGOTTO, G.; ROSOLEN, A.; PINNA, L. A.; MEGGIO, F.; MORO S. Identification of ellagic acid as potent inhibitor of protein kinase CK2: a successful example of a virtual screening application. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 8, p. 2363-2366, 2006.
61. TRIBALLEAU, N.; ACHER, F.; BRABET, I.; PIN, J.-P.; BERTRAND, H.-O. Virtual screening workflow development guided by the "receiver operating characteristic" curve approach. application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 7, p. 2534-2547, 2005.

62. ROGNAN, D.; LAUEMOLLER, S. L.; HOLM, A.; BUUS, S.; TSCHINKE, V. Predicting binding affinities of protein ligands from three-dimensional models: application to peptide binding to class I major histocompatibility proteins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 22, p. 4650-4658, 1999.
63. ODA, A.; TSUCHIDA, K.; TAKAKURA, T.; YAMAOTSU, N.; HIRONO, S. Comparison of consensus scoring strategies for evaluating computational models of protein–ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 1, p. 380-391, 2005.
64. POWERS, J. C.; ASGIAN, J. L.; EKICI, O. D.; JAMES, K. E. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4639-4750, 2002.
65. MALVEZZI, A.; DE REZENDE, L.; Do AMARAL, A T. Pharmacophore Model of Cruzain Inhibitors. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 28, n. 8, p. 781-784, 2009.
66. LIDIA, M. L.; ELIEZER, J. B. Bioisosterism: A Useful Strategy for Molecular Modification and Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 23-49, 2005.

Capítulo 6



Planejamento de inibidores da enzima Diidroorotato desidrogenase

Neste capítulo são apresentados os métodos e estratégias usados para a seleção e identificação de inibidores da enzima TcDHODH, bem como os resultados obtidos e as discussões sobre os mesmos.

6.1. Materiais e métodos

Assim como para a seleção dos inibidores da enzima TcGAPDH, os ensaios virtuais e os estudos de modelagem molecular foram realizados no Laboratório de Quiminformática e Modelagem Molecular do Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais – NEQUIMED-PN, do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Os trabalhos foram desenvolvidos em estações Linux Fedora 10 utilizando-se os bancos de dados e softwares listados na Tabela 6.1.

Tabela 6.1 - Relação de softwares/banco de dados e suas aplicações dentro do processo de seleção de inibidores da enzima TcDHODH

Software/banco de	Aplicação
PDB ¹	Obtenção das estruturas tridimensionais da enzima DHODH
UCSF Chimera ²	Sobreposição e análise das estruturas tridimensionais das proteínas
SiteID ³	Busca por novas cavidades de interação
ZINC database ⁴	Banco de dados inicial contendo estruturas moleculares de compostos
Filter ⁵	Buscas por subestruturas utilizando-se padrões SMARTS
Emolecules ⁶	Recuperação dos dados sobre a disponibilidade comercial dos compostos
LigPrep	Preparo das estruturas 3D dos ligantes
Maestro ⁷	Análise gráfica e preparação das estruturas 3D do alvo
Autodock ^{8,9}	Docagem dos compostos mais bem pontuados de acordo com a análise
Autodocktools ¹⁰	Análise gráfica dos resultados da docagem feita pelo programa Autodock

A estratégia adotada para a aplicação dos ensaios virtuais no planejamento de inibidores da enzima TcDHODH, consistiu de várias etapas nas quais as informações adquiridas em cada uma delas serviram como base para o estabelecimento de hipóteses a serem validadas nas etapas seguintes. Para isso, foram empregadas diferentes ferramentas com o objetivo de se obter uma descrição mais adequada do sistema estudado durante o processo de seleção dos compostos a serem avaliados *in vitro*. Um esquema ilustrativo da estratégia adotada é mostrado na Figura 6.1.

Inicialmente, foi feita uma busca por estruturas cristalográficas das enzimas TcDHODH e HsDHODH no banco de dados PDB para a análise dos parâmetros estruturais e a escolha dos modelos mais adequados para os estudos posteriores de modelagem molecular e SBVS. Em seguida, utilizando-se o módulo de alinhamento de proteínas MatchMaker implementado no programa de análises gráficas UCSF

Chimera, efetuou-se a comparação das estruturas para identificação das diferenças e similaridades estruturais que pudessem contribuir para seleção de inibidores seletivos da enzima TcDHODH. Com base nestas análises, decidiu-se buscar por novas regiões passíveis de serem exploradas para o planejamento de inibidores, utilizando-se o programa SiteID; módulo disponível no pacote computacional de modelagem Sybyl8.0® (Tripos, Inc).

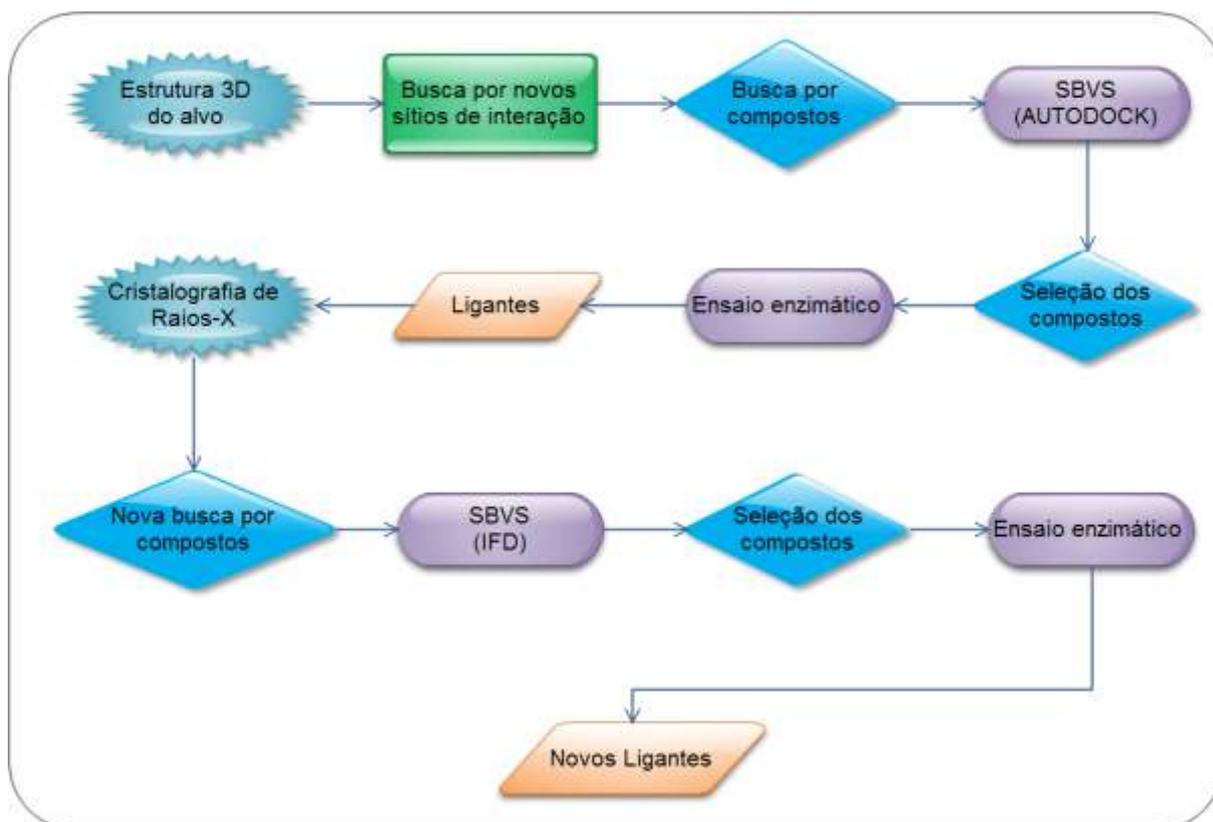


Figura 6.1 - Esquema estratégico adotado para o planejamento de novos inibidores da enzima TcDHODH

O preparo das estruturas de input para o programa SiteID consistiu apenas da remoção das moléculas de ligantes (apenas os cofatores foram mantidos), águas e gliceróis, cristalizados com as estruturas das enzimas obtidas do PDB. Os parâmetros definidos no programa estão listados na Tabela 6.2.

Em seguida, as hipóteses geradas a partir dos resultados da busca por novas cavidades foram utilizadas para guiar diversas buscas por análogos do produto de reação (ORO), substituídos em posições estrategicamente estabelecidas, e capazes explorar as regiões de interesse no sítio da TcDHODH. Estas buscas foram efetuadas nos bancos de dados de estruturas comercialmente disponíveis ZINC e EMOLECULES.

Tabela 6.2 - Parâmetros utilizados para a busca por cavidades com o programa SiteID

Parâmetro	Valor
Especificações da Grade:	
Resolução	1,0 Å
Profundidade do filme da proteína	3,0 Å
Distância entre a proteína e os pontos da grade:	
Profundidade do filme atômico	3,0 Å
Raio de exclusão	2,5 Å
Raio de inclusão	8,0 Å
População mínima de átomos dentro do raio de inclusão	80
Critério de primário para distância entre as populações:	
Raio de inclusão	2,0 pontos da grade
População mínima de pontos da grade dentro do raio de inclusão	7
Critério de secundário para distância entre as populações:	
Raio de inclusão do agrupamento	3,0 Å
População mínima de pontos da grade dentro do raio da cada agrupamento	10
População máxima de pontos da grade dentro do raio da cada agrupamento	300

As buscas efetuadas no banco de dados ZINC, mais especificamente a coleção de referência 6_p0.smi.gz, foram realizadas utilizando-se o programa Filter, através do uso das representações no padrão SMARTS mostradas na Figura 6.2. Para as buscas no banco de dados Emolecules foi utilizado o sistema de filtro por subestruturas disponível do próprio site, seguido da seleção interativa dos análogos substituídos do ORO.

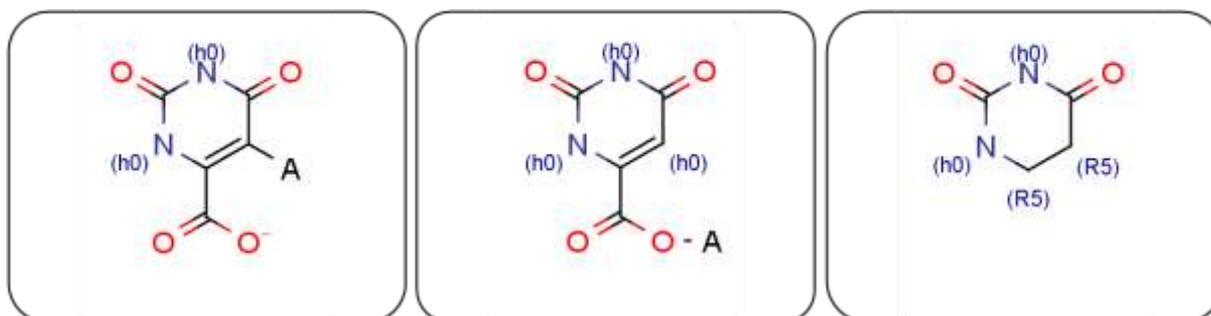


Figura 6.2 - Padrões SMARTS utilizados na busca por análogos substituídos do ORO no banco de dados ZINC. “h0”: apenas 1 átomo hidrogênio conectado; “A”: qualquer átomo diferente de hidrogênio conectado; “R5”: o átomo de carbono deve fazer parte de um anel de cinco membros

As estruturas 3D dos compostos recuperados dos bancos de dados foram então preparadas utilizando o programa LigPrep disponível no pacote computacional Maestro® (Schrödinger, Inc), para a estruturação da coleção de compostos a ser

utilizada posteriormente nos estudos de SBVS utilizando-se o programa Autodock, Os parâmetros definidos no programa LigPrep são mostrados na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Parâmetros usados para preparação das estruturas 3D dos compostos docados na TcDHDOH

Parâmetro	Valor
Campo de Força	OPLS_2005
Estereoisômeros	Manter a quiralidade de entrada
Ionização	Epik - pH = 8,0 ± 0,0
Número máximo de estereoisômeros	1
Número de conformações com baixa energia para anéis	1
Remover contra íon (Desalt)	

Após a preparação das estruturas 3D, todos os ligantes foram visualmente inspecionados para verificar possíveis erros nos estados de protonação e a presença de formas tautoméricas e conformações exóticas, as quais foram corrigidas ou excluídas.

A *priori* dos estudos de docagem molecular, a estrutura da enzima foi cuidadosamente inspecionada e em seguida refinada utilizando-se o módulo de preparação de estruturas para docagem, contido no pacote de modelagem Maestro® (Schrödinger, Inc). Para isso, foram feitas as correções das ordens de ligação dos átomos localizados até 8 Å do ligante OXO (inclusive a FMN) e a definição dos estados de protonação resíduos e moléculas dentro da região de interesse, como mostrado Tabela 6.4.

Tabela 6.4 - Estados de protonação definidos para os resíduos presentes na região preparada para o SBVS

Resíduo	Estado de protonação	Carga formal
OXO	N5 e carboxila desprotonados	-1
FMN	Oxidado	-2
Cys	Protonada	Neutra
Lys	Protonada	+1
Asp	Desprotonado	-1
Arg	Protonada	+1
Glu	Desprotonado	-1

Em seguida foi feita a remoção de todas as moléculas de água e de glicerol presentes na estrutura, seguida do relaxamento da estrutura do complexo através de

minimização de energia, para o posicionamento adequado dos hidrogênios polares e redução de possíveis contatos desfavoráveis entre as cadeias laterais dos resíduos do sítio com o ligante ou com o cofator. Finalmente, após a minimização, apenas o ligante OXO foi extraído e as coordenadas das estruturas do ligante e da enzima preparadas foram salvas separadamente nos formatos mol2 e pdb, respectivamente, para utilização nas etapas posteriores.

A adequação da estrutura da enzima para a docagem utilizando-se o programa Autodock, foi feita através de sua interface AutodockTools (ADT). Para isso, a estrutura previamente refinada na primeira etapa teve todos os hidrogênios não-polares removidos e cargas de Gasteiger¹¹ adicionadas. Em seguida os resíduos Leu71, Cys130 e Ser99 foram definidos como parte da proteína a ser considerada flexível durante a docagem dos ligantes, e salvos separadamente do restante da estrutura que seria considerada rígida. Após isso, utilizando-se como referência o resíduo Cys130, foi delimitada a região do sítio na qual as moléculas seriam docadas. O centróide da caixa utilizada foi fixado sobre o átomo de enxofre da Cys130 e mesma dimensionada de modo que englobasse todos os resíduos pertencentes à região de interesse, originando uma grade com resolução de 0,375 Å centrada nas coordenadas -7,38, 21,60 e 18,0 e dimensões de 42x44x58 pontos, nas direções x, y e z, respectivamente. Em seguida, foram gerados os mapas de potenciais para os tipos de átomos contidos dentro desta região da proteína.

Uma vez preparada a estrutura do alvo, as coordenadas 3D dos compostos pertencentes à coleção estruturada previamente, foram preparadas para se adequar ao programa Autodock pela adição das cargas de Gasteiger e pela definição das ligações flexíveis durante o processo de busca conformacional, o qual foi realizado utilizando-se o protocolo de Ensaio Virtual descrito na documentação do programa¹². Todos os graus de liberdade rotacionais presentes nos ligantes foram permitidos exceto as ligações do tipo peptídicas. Após o estabelecimento dos tipos de átomos presentes nos compostos da coleção, o programa AutodockTools foi novamente utilizado para gerar todos o mapas de potenciais correspondentes.

A verificação da consistência dos parâmetros que seriam adotados na docagem da coleção contendo os compostos recuperados dos bancos de dados ZINC e Emolecules, foi feita através da redocagem do ligante OXO na estrutura da TcDHODH. A Tabela 6.5 mostra a configuração final adotada para os parâmetros.

Todos os demais que não estão listados na Tabela 6.5 foram mantidos nas configurações padrões do programa.

Tabela 6.5 - Parâmetros usados para a docagem molecular com o programa Autodock

Parâmetro	Valor	Definição
Search method	LGA	Algoritmo de busca utilizado
ga_pop_size	150	Número de indivíduos na população conformacional inicial a ser avaliada
ga_num_evals	1750000	Número máximo de avaliações de cada membro da população inicial
ga_run	100	Número de vezes que a população inicial de conformâmeros será gerada

Após a docagem, os valores das energias calculados pela função de pontuação foram coletados, e o grupamento de poses gerado através das ferramentas de análise do programa ADT. Os valores das energias juntamente com a análise de grupamentos, complementaridade das poses com a forma do sítio e ligações de hidrogênio foram visualmente inspecionadas para a seleção de 9 compostos que foram subsequentemente adquiridos comercialmente e testados *in vitro* contra a enzima TcDHDOH.

Os testes *in vitro* contra a enzima foram realizados pela doutoranda do grupo NEQUIMED-PN, Juliana Cheleski, como parte do seu projeto. Estes consistiram de duas etapas. Primeiramente, foram realizados experimentos espectrofotométricos utilizando-se um equipamento Shimadzu UV-1800 para a determinação do percentual de inibição.

As condições do ensaio foram elaboradas para um volume total de 600 μ L contendo 200 μ M de Inibidor, 150 μ M de substrato Fumarato, 50 μ M de Diidroorotato (DHO), enzima TcDHODH 50 nM em Tampão Tris 20 mM, NaCl 150 mM em 5% v/v de DMSO, 25°C, pH 8.0. O experimento controle foi realizado na ausência do inibidor e em seguida na presença de 200 μ M da substância a ser avaliada. A reação foi iniciada após a adição da enzima e foi monitorada a formação do produto ORO no comprimento de onda de 300 nm durante 100 s. Antes da realização dos ensaios de inibição, as soluções contendo cada inibidor e os demais componentes (exceto a enzima), tiveram o espectro varrido de 200 a 600 nm para avaliar a região de absorbância das moléculas e possíveis interferências no comprimento de onda da análise.

As medidas foram tomadas em, no mínimo, duplicatas e a atividade da enzima foi monitorada individualmente para cada inibidor. A velocidade da reação foi

calculada pela lei das velocidades inicial e os percentuais de inibição foram calculados a partir da Equação 6.1.

$$\%I = \left(1 - \frac{V_i}{V}\right) \cdot 100$$

Equação 6.1 - Cálculo do percentual de inibição: V_i é a velocidade da reação na presença do inibidor, que neste caso corresponde à taxa de formação do produto (absorbância em função do tempo) obtida através de ajuste linear no intervalo entre 20 e 60 s da reação, na presença do inibidor; V corresponde à taxa de formação do produto na ausência de inibidor.

Na segunda etapa dos ensaios enzimáticos, somente os compostos cujo percentual de inibição foi superior a 50% nos experimentos espectrofotométricos, foram avaliados através de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) para a determinação da constante de inibição (K_i). Todos os experimentos ITC foram realizados em equipamento VP-ITC da Microcal (Northampton, MA).

A entalpia aparente de conversão do DHO à ORO foi determinada preenchendo-se a cela de amostra com o FUM 1.6 mM, e enzima TcDHODH 300 mM. A seringa foi preenchida com DHO 3 mM e utilizou-se o método de injeção única com volume igual a 10 μ L. Após a injeção os dados foram registrados por um período de 1200 s, no qual foi observado o termino da reação. O valor determinado foi de $\Delta H_{app} -11.64 \pm 1.78 \text{ kcal mol}^{-1}$.¹³

Previamente aos ensaios de inibição foram determinados os parâmetros cinéticos da reação em relação à conversão do DHO. Para isso, preencheu-se a seringa com DHO 1 mM em 5% v/v de DMSO e a cela de amostra com FUM 1,6 mM, TcDHODH 50 nM em 5% v/v de DMSO, Tris 20 mM, 150 mM NaCl e pH 8,0. Em seguida foram efetuadas 12 injeções de 1 μ L, com intervalos de 60 s, para garantir a cinética de pseudo-primeira ordem com relação ao substrato DHO. Todos os experimentos foram realizados em duplicata a 25 °C, calor de referência de 25 μ cal s^{-1} , velocidade de agitação na cela de 307 rpm.

Os ensaios de inibição foram realizados adicionando-se conjuntamente na cela de amostra o composto a ser testado, sob as mesmas condições experimentais utilizadas para a determinação dos parâmetros cinéticos, em concentração fixa igual a 100 μ M. Cada ensaio foi precedido por um experimento controle. Em seguida as constantes de inibição (K_i) foram obtidas através da regressão não-linear dos

mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten na ausência e na presença do inibidor.

Com base nos resultados dos ensaios *in vitro* desta primeira coleção de compostos, dois compostos ativos foram cristalizados em complexo com a enzima ortóloga DHODH de *Leishmania Major* (LmDHODH). Esta parte do trabalho foi realizada pelo aluno de doutorado Matheus Pinto Pinheiro do LCP-RP através da colaboração com a Profa. Dra. Maria Cristina Nonato (FCFRP-USP).

Os cristais da enzima LmDHODH nativa foram obtidos segundo o protocolo determinado por CORDEIRO *et al.*¹⁴ A incorporação dos inibidores nos cristais foi realizada através de técnica de “soaking”.¹⁵ Neste caso, os cristais foram incubados por um minuto em solução crio-protetora, idêntica à aquela descrita no protocolo já estabelecido, acrescida de 10 mM de cada inibidor.

Os experimentos de difração de raios-X foram realizados em fonte de radiação Síncrotron da linha de cristalografia de proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (DO3BMX1-LNLS). As coletas dos dados foram realizadas com comprimento de onda, λ , igual a 1,437 Å, em temperatura criogênica (100 K) e os dados registrados em um detector do tipo marCCD165 (MarResearch).

Cada conjunto de imagens coletado foi processado utilizando-se o programa MOSFLM¹⁶ e escalonado com o programa SCALA (CCP4)¹⁷, separando-se 5 % das reflexões totais para o conjunto teste (R_{free}) a ser utilizado para validação cruzada dos modelos gerados.¹⁸ As fases iniciais foram obtidas por substituição molecular com o programa MOLREP¹⁹, usando as coordenadas de LmDHODH na forma apo como modelo.

O refinamento da estrutura cristalográfica foi realizado utilizando o programa REFMAC (CCP4) onde está implementado o princípio de máxima entropia (“Maximum Likelihood”).²⁰

A construção visual da estrutura foi realizada no programa gráfico Coot.²¹ O ajuste manual das posições atômicas foi realizado levando-se em consideração as restrições estereoquímicas, assim como a concordância com os mapas pesados de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ ($2mF_o - DF_c$), com σ igual a 1, e o mapa diferença $F_o - F_c$ ($mF_o - DF_c$), com σ igual a 3. F_o (hkl) corresponde ao fator de estrutura observado para a reflexão hkl e F_c corresponde ao fator de estrutura para a reflexão hkl

calculado baseado no modelo. m e D são estimativas de erro para cada reflexão hkl , calculadas a partir do conjunto teste de reflexões.

Após o ajuste de todos os aminoácidos na densidade eletrônica ($2F_o - F_c$), moléculas de água foram automaticamente adicionadas pelo programa Coot através das posições dos picos no mapa diferença $F_o - F_c$, com σ igual a 3, e validadas através da checagem visual levando-se em consideração o ambiente químico de cada molécula de solvente. Algumas moléculas de águas, que não foram encontradas automaticamente, foram adicionadas manualmente.

O sucesso de cada ciclo de refinamento foi monitorado através da diminuição dos valores de R_{factor} e R_{free} , até a obtenção de valores aceitáveis para a resolução na qual o modelo estava sendo refinado.

Os resultados encontrados através dos ensaios *in vitro* e a obtenção dos complexos de dois inibidores com a enzima LmDHODH deram suporte para uma nova seleção de compostos. Para isso foi utilizado o protocolo de docagem molecular com ajuste induzido (IFD), disponível no pacote computacional Maestro. A docagem, utilizando-se este protocolo, foi efetuada definindo-se os parâmetros do programa como mostrados na Tabela 6.6. Os demais parâmetros foram mantidos nas configurações default do programa.

Tabela 6.6 - Parâmetros utilizados para a docagem através do protocolo IFD

Caixa envolvendo a região a ser explorada com o programa Glide		
Parâmetro	Valor	Definição
Centróide da caixa	B:2352	Caixa centrada no Oxonato da cadeia B
Restrição de interação de hidrogênio no receptor	B:194:_OD1	Aceitar Somente poses nas quais o ligante interage através de ligação de hidrogênio com o resíduo Asn194
1° Passo: Docagem com o programa Glide		
Preparação e refinamento da proteína	Desmarcado	Não preparar ou refinar a estrutura da proteína
Remoção das cadeias laterais	B:130,B:71	Docar o ligante sem os resíduos Cys130 e Leu71
2° Passo: Ajuste induzido com o programa Prime		
Distância, a partir da pose, para o refinamento	4 Å	Minimizar os resíduos até esta distância da pose obtida na docagem
Resíduos adicionais	B:99	Refinar o resíduo de Ser99 na última etapa
3° Passo: Redocagem com o programa Glide		
Função de pontuação	XP	Utilizar a função de pontuação com precisão extra

Por último, as poses e as energias preditas através do IFD foram cuidadosamente analisadas para a seleção de uma nova coleção a ser avaliada *in vitro* contra a TcDHODH, através do mesmo protocolo realizado previamente, para identificação de novos inibidores.

6.2. Resultados e discussões

6.2.1. Análise das estruturas tridimensionais da enzima DHODH

A busca por estruturas da enzima do alvo no PDB resultou em oito modelos encontrados para a TcDHODH e nove para HsDHODH. Os dados referentes a cada modelo estão apresentados na Tabela 6.7.

Tabela 6.7 - Código PDB do modelo, parâmetros estruturais e ligantes complexados

TcDHODH					
Código	Resolução (Å)	R _{factor}	R _{free}	(R _{free} - R _{factor})	Ligante
2DJL	1,38	0,165	0,183	0,018	Succinato
2DJX	1,58	0,181	0,204	0,023	-
2E68	1,38	0,168	0,183	0,015	Dihidroorotato
2E6A	1,64	0,162	0,192	0,03	Orotato
2E6D	1,94	0,156	0,2	0,044	Fumarato
2E6F	1,26	0,166	0,18	0,014	Oxonato
3C3N	2,2	0,207	0,251	0,044	-
2DJL	1,38	0,165	0,183	0,018	Succinato
HsDHODH					
Código PDB	Resolução (Å)	R _{factor}	R _{free}	(R _{free} - R _{factor})	Ligante
2B0M	2,00	0,218	0,249	0,031	Orotato e 201
2BXV	2,15	0,203	0,223	0,020	Orotato e 3FT
2FPT	2,40	0,175	0,211	0,036	Orotato e ILB
2FPV	1,80	0,195	0,205	0,010	Orotato e ILC
2FPY	2,00	0,181	0,200	0,019	Orotato e ILF
2FQI	1,95	0,185	0,202	0,017	Orotato e ILH
2PRH	2,40	0,172	0,217	0,045	Orotato e 238
2PRL	2,10	0,168	0,194	0,026	Orotato e R2C
2PRM	3,00	0,190	0,253	0,063	Orotato

201: ácido 3-amido-5-bifenil-benzóico;

3FT: ácido 2-((3-fluoro-3'-(trifluorometoxi)bifenil-4-ilamino)carbonil)ciclopent-1-eno-1-carboxílico;

ILB: 2-((3,5-difluoro-3'-(trifluorometoxi)bifenil-4-ilamino)carbonil)ciclopent-1-eno-1-carboxílico;

ILC: 3-((3-fluoro-3'-metoxibifenil-4-il) aminocarbonil)tiofeno-2-carboxílico;

ILF: 3-((3,5-difluoro-3'-(trifluorometoxi)bifenil-4-ilamino)carbonil)tiopheno-2-carboxílico;

ILH: 2-((2,3,5,6-tetrafluoro-3'-(trifluorometoxi) bifenil-4-ilamino)carbonil)cyclopenta-1,3-dieno-1-carboxílico;

238: 6-chloro-2-(2'-fluorobifenil-4-il)-3-metilquinoline-4-carboxílico;

R2C:5-metoxi-2-(4-phenoxyfenil)aminobenzóico

Diversas estruturas de complexos da TcDHODH, com ambos os substratos, estão disponíveis em altas resoluções e com ótimos parâmetros cristalográficos. Baseado nesses fatores, várias estruturas têm características apropriadas para

ensaios virtuais. Os modelos 2E6F e 2FPV foram escolhidos para as análises posteriores por apresentarem os melhores conjuntos de parâmetros estruturais.

6.2.2. Análise do sítio

A enzima DHODH é encontrada em ambos os organismos; humano e do parasito *T. cruzi*. Entretanto, a enzima presente em humanos já é bem explorada para o desenvolvimento de fármacos contra artrite reumatóide, por exemplo. Como discutido na seção 2.2.5, a inibição não-seletiva da enzima GAPDH não provoca grandes efeitos adversos em células humanas. Entretanto, a inibição não-seletiva da enzima DHODH pode levar a atividades terapêuticas completamente distintas das estabelecidas como foco deste trabalho.

A estratégia adotada para o planejamento de inibidores da DHODH foi estabelecida com o objetivo de explorar as diferenças estruturais entre as enzimas, para selecionar moléculas capazes de interagir seletivamente com a enzima TcDHODH.

As enzimas DHODHs de *T. cruzi* e humana pertencem a famílias distintas, estão distribuídas diferentemente dentro da célula, e possuem um grau de identidade de apenas 27% quando levada em consideração a sequência primária de aminoácidos. Não obstante, compartilham de um grau de identidade de aproximadamente 77% quando se trata apenas dos resíduos de aminoácido do sítio catalítico envolvidos na interação com o substrato.

Na Figura 6.3 é mostrado o alinhamento entre as sequências primárias da TcDHODH e HsDHODH. Nesta, podemos observar uma das diferenças mais importantes entre as duas enzimas. A enzima de humanos possui duas alfas-hélices sequenciais formadas entre os resíduos Gly33 e Pro69 (região em amarelo) que não estão presentes na estrutura da enzima do *T. cruzi*. Esta região, por sua vez, é responsável pela formação do sítio de interação para o qual todos os fármacos inibidores da enzima HsDHODH foram desenvolvidos.²² A ausência desta região na enzima ortóloga TcDHODH torna improvável o planejamento de inibidores capazes de usufruir do mesmo modo de interação, uma vez que não há formação de uma cavidade que caracterize um sítio com o qual moléculas possam interagir eficientemente para modular a atividade da enzima.

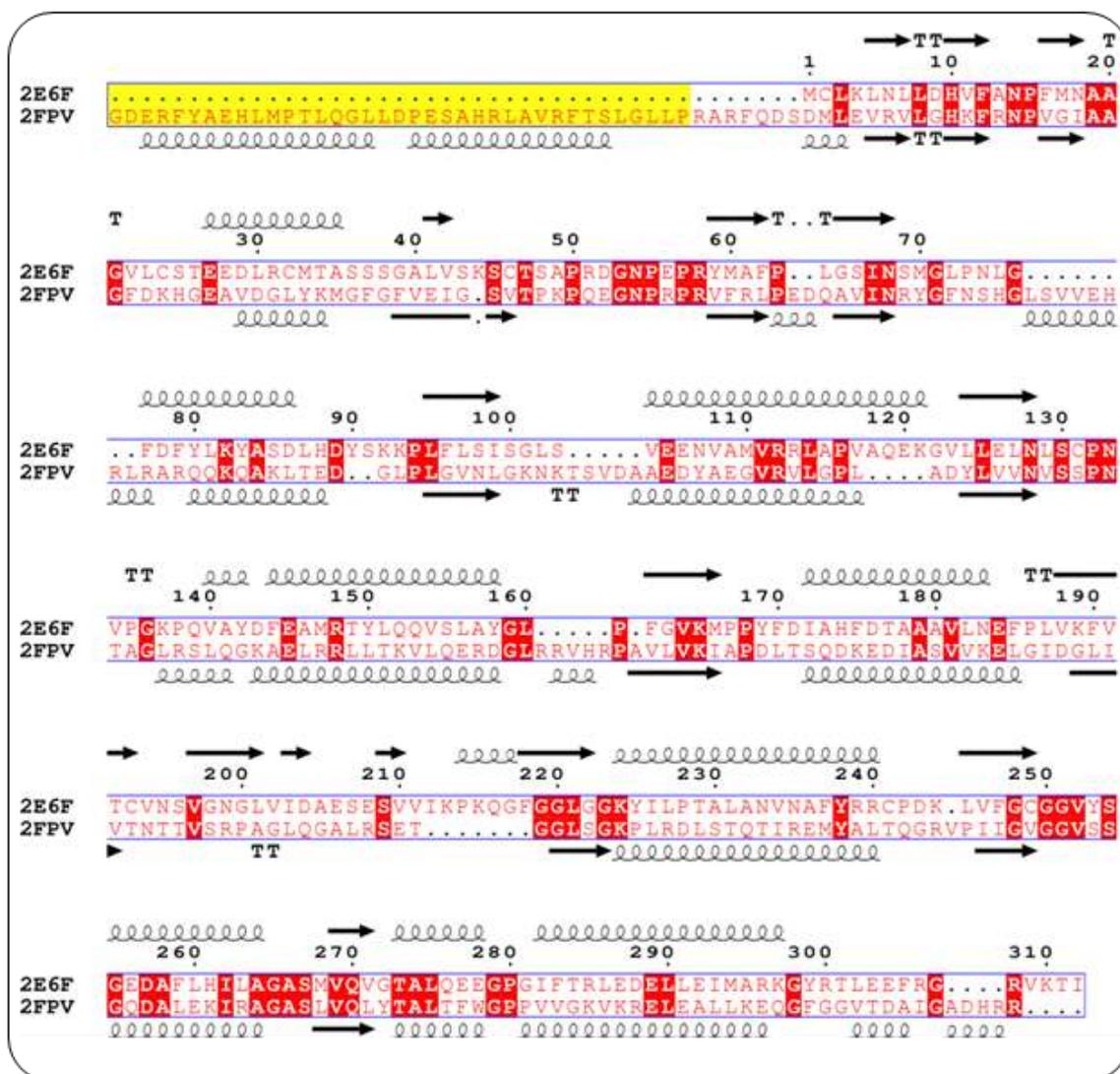


Figura 6.3 - Alinhamento entre as sequências primárias dos monômeros das enzimas TcDHODH e HsDHODH utilizando software ESript 2.2.²³

As características pelas quais se define uma região apropriada ou não para interação, dependem do tipo de molécula reconhecida pela mesma. Em geral, sítios de interação proteína-proteína são mais planares, superficiais e expostos ao solvente, pois neste tipo de interação é mais vantajosa, devido ao efeito hidrofóbico, a extensão da região do que a presença de interações específicas, já que a especificidade, neste caso, é consequência da forma molecular e não de interações hidrofílicas. Por outro lado, as regiões adequadas para interação de pequenas moléculas para modulação da atividade de alvos macromoleculares são, usualmente, cavidades pequenas, menos expostas e discretas quando comparadas ao tamanho das proteínas.²⁴ As formas das cavidades são, na maioria das vezes, parcialmente influenciadas pela aproximação dos ligantes ou substratos com os

quais interagem devida indução à modificações conformacionais. Portanto, o tamanho, a forma, a profundidade e a extensão de um sítio, podem ditar o tipo de ligante que pode ser acomodado e até mesmo suas propriedades físico-químicas. Assim, entender as propriedades do sítio é também entender os compostos capazes de interagir com o mesmo, pois provê uma ferramenta extremamente útil para elucidação das propriedades dos ligantes necessárias para reconhecimento molecular.

De acordo com o alinhamento das estruturas primárias, observamos que há uma baixa conservância entre as estruturas das duas proteínas. Apenas 83 resíduos de um total de 311 são conservados. Entretanto, quando tomamos como referência um alinhamento molecular tridimensional é possível perceber um alto grau de homologia entre as regiões dos sítios catalíticos. Uma vez que o alinhamento tridimensional não depende unicamente da sequência primária das duas proteínas, podemos levar em conta também resíduos pertencentes a posições totalmente distintas na sequência primária, mas que compartilham da mesma posição no espaço.

A Figura 6.4 Mostra uma representação em fitas das estruturas das enzimas HsDHODH e TcDHODH, alinhadas tridimensionalmente com bases nos $C\alpha$ dos resíduos de aminoácidos constituintes. Nesta, podemos observar a diferença entre as estruturas 3D das duas proteínas na região onde se localiza o domínio N-terminal, utilizado apenas pelas enzimas da Família 2 para a ancoragem na membrana celular e ausente na enzimas da Família 1, como a TcDHODH.

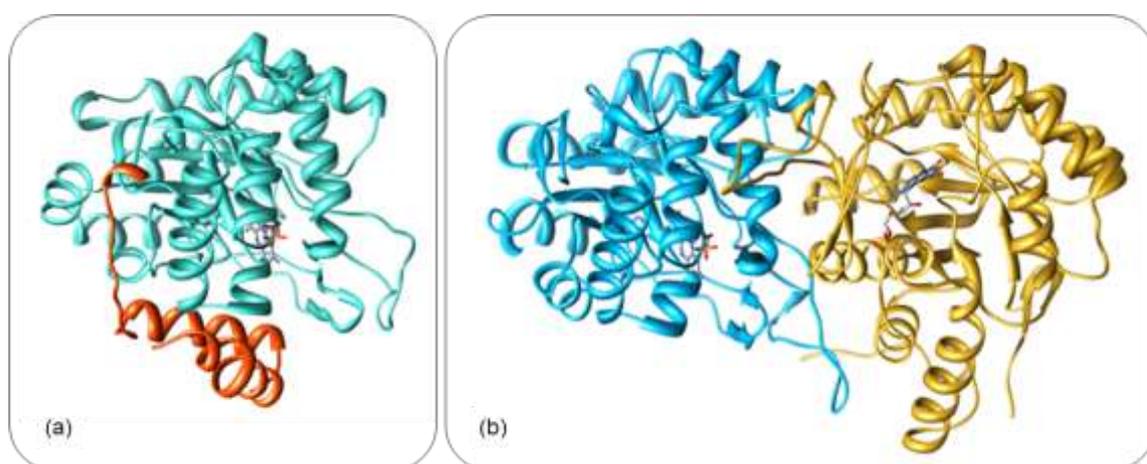


Figura 6.4 - Representação em fitas das estruturas alinhadas das enzimas (a) HsDHODH e (b) TcDHODH. O domínio N-terminal presente na estrutura da enzima humana e ausente na do T. cruzi está colorido em laranja

O alto grau de similaridade entre os sítios catalíticos das duas enzimas é de certa forma esperado, uma vez que catalisam a mesma reação de conversão do DHO à ORO, através de mecanismos bastante semelhantes. As Figura 6.5 (a) e (b) mostram um esquema bidimensional das principais interações feitas pelos ligantes Oxonato e Orotato com os resíduos do sítio ativo, nas estruturas da TcDHODH (2E6F) e HsDHODH (2FPV), respectivamente. Uma informação clara quando comparamos os dois mapas, é que ambos os sítios possuem interações com resíduos de Asparagina, Lisina e até mesmo ligações com átomos que compõem a cadeia principal, que são conservados nas estruturas das enzimas. Isto, provavelmente, deve dificultar o reconhecimento seletivo de ligantes pelo sítio, já que o único resíduo efetivamente distinto entre as proteínas é a base para a catálise, Cys130 na TcDHODH e Ser215 na HsDHODH.

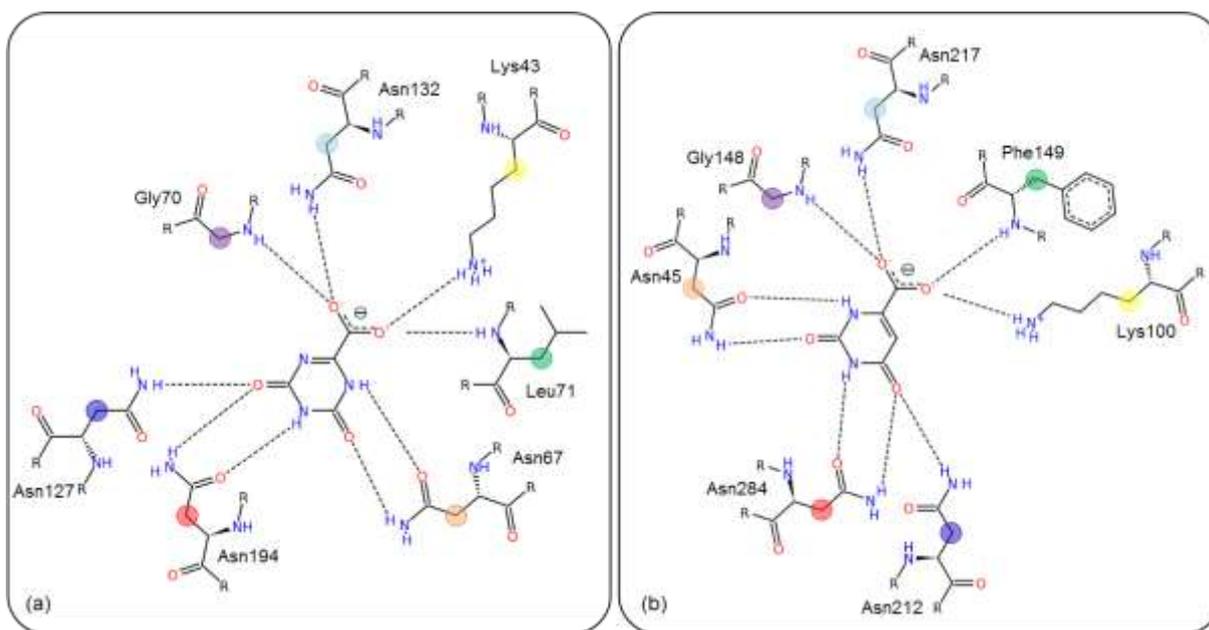


Figura 6.5 - Mapa de interações do complexo (a) Oxonato-TcDHODH (2E6F) e (b) Orotato-HsDHODH (2FPV). Resíduos com identidade ou características de interação conservadas estão marcados com os círculos de mesma cor nas duas figuras. Figura gerada no programa PoseView²⁵

Este fator, aliado ao pequeno volume da cavidade do sítio ativo, que é enterrado na cadeia polipeptídica da proteína e definido por várias interações extremamente específicas, torna o uso desta região pouco promissora para o planejamento de inibidores competitivos, seletivos e de alta afinidade frente a qualquer das duas enzimas.

6.2.3. Novas hipóteses para o planejamento de inibidores da TcDHODH

Tendo em vista a impossibilidade de explorar a cavidade formada pelo domínio N-terminal para o planejamento de ligantes, e a alta similaridade entre os sítios ativos das enzimas, foi feita uma busca por novas regiões distintas entre as duas proteínas e capazes acomodar ligantes com alta afinidade e potencial para inibição seletiva da enzima TcDHODH. Esta busca foi efetuada através do programa SiteID.

O programa SiteID identifica cavidades com características de sítios de interação na estrutura 3D de biomacromoléculas, inundando todas as cavidades da mesmas com moléculas de água ou esferas. Basicamente, o SiteID pode funcionar de dois modos: Através da *busca por cavidades locais* – Este modo é útil para a busca de prováveis sítios de interação para pequenas moléculas; ou *criando tabelas de descritores baseado nos átomos* - Este modo é mais útil quando se busca por sítios de interação do tipo proteína-proteína ou proteína-DNA, pois estas regiões são tipicamente superficiais e com características hidrofóbicas.

Quando a busca por cavidades locais é feita, dois métodos distintos estão disponíveis: O primeiro é chamado de *método da solvatação*, que possui muitas limitações, dentre elas, a falha na identificação de cavidades estreitas e a dependência com a orientação da proteína. O segundo, que não apresenta estas limitações, é baseado numa *grade tridimensional* (do inglês, *Grid-based*) e por este motivo foi escolhido para a busca de prováveis sítios interação. Seu método de operação é ilustrado na Figura 6.6.

Na primeira etapa (1), estabelece-se uma grade 3D que engloba toda proteína. Parâmetros tais como: resolução da grade (distância entre os pontos) e a espessura da camada de esferas (representadas por átomos de oxigênio) foram mantidos nas suas opções padrão. A etapa seguinte (Etapa 2) consiste na retirada dos pontos da grade situados sobre os átomos da proteína. Mantendo apenas os pontos dentro de um determinado raio de inclusão, $r = 2,5 \text{ \AA}$.

Na próxima etapa (Etapa 3), o programa mantém apenas os pontos da grade que possuem uma população mínima de n heteroátomos da proteína dentro de uma região delimitada pelo raio de exclusão (R). Finalmente, são mantidos os pontos da grade que definem uma cavidade característica de sítio de interação. A separação S mínima entre diferentes grupamentos (Etapa 4) é, por padrão, igual a 3 \AA .

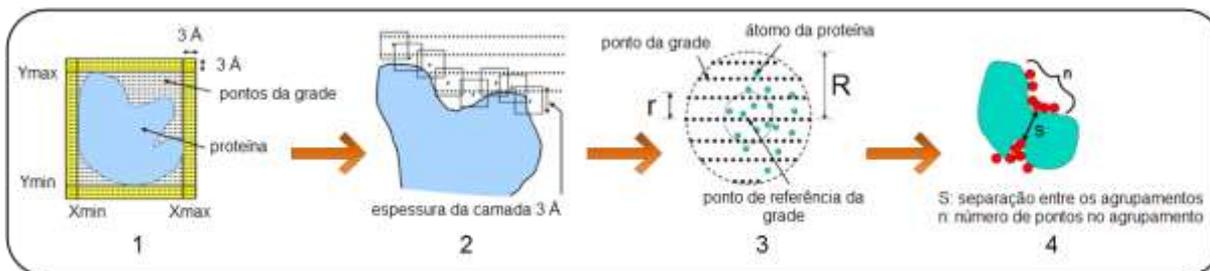


Figura 6.6 - Método baseado em grade 3D utilizado pelo programa SiteID para identificação de sítios de interação

A busca realizada pelo programa SiteID resultou em pelo menos 5 cavidades com características bastante relevantes para o planejamento de inibidores seletivos à enzima TcDHODH. Nas Figura 6.7 (a) e (b) podemos observar a localização e distribuição destas regiões nas estruturas tridimensionais das enzimas TcDHODH e HsdHODH, respectivamente.

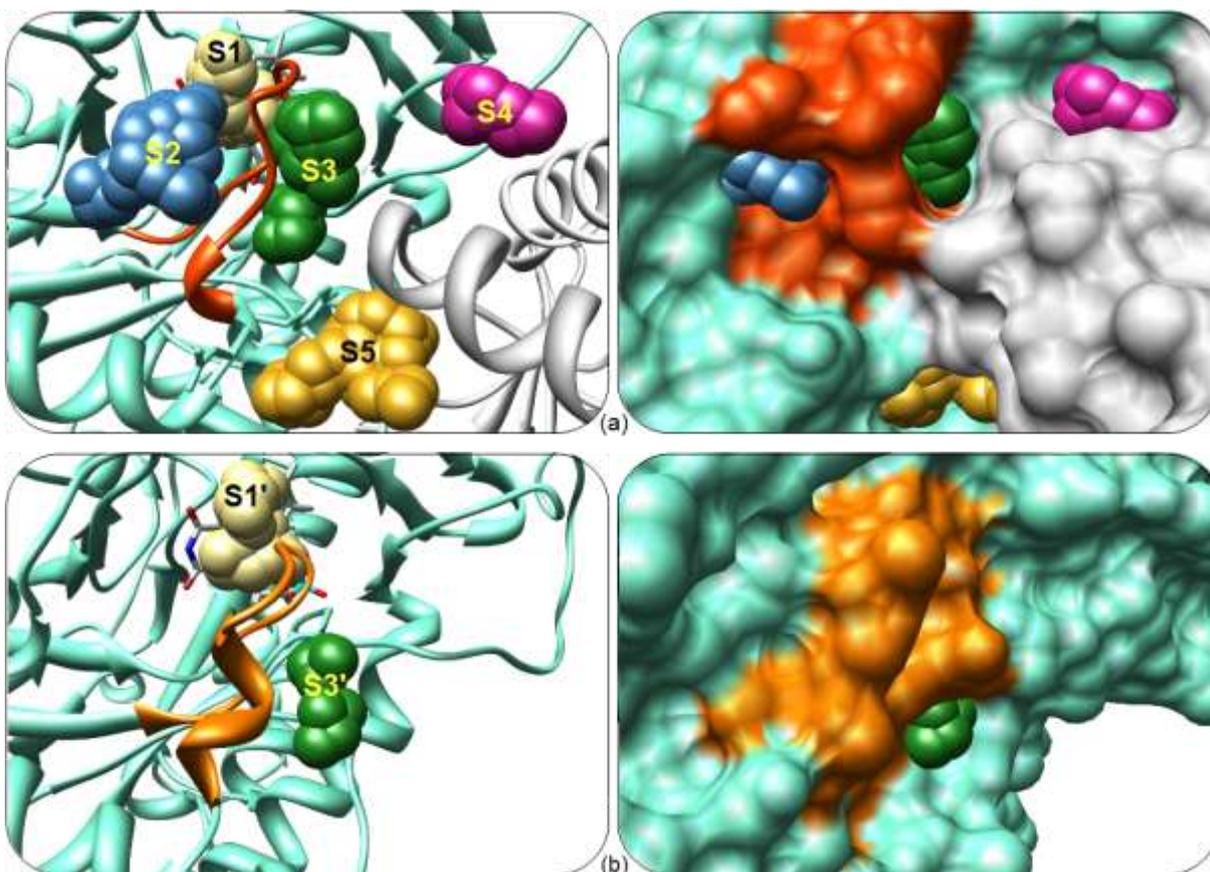


Figura 6.7 - Representação da localização das cavidades encontradas pelo programa SiteID: para (a) TcDHODH e (b) HsdHODH, representadas em fitas e pela superfície de van der Waals. Cada cavidade está indicada pelo respectivo código e a alça ativa ($\alpha 4\text{-}\beta A$) colorida em laranja

O sítio S1 (bege), está definido como a região pertencente ao sítio catalítico da enzima TcDHODH e, como discutido previamente, é pouco provável que se

planeje um inibidor seletivo que interaja apenas nesta cavidade, uma vez que ela compartilha de uma similaridade bastante alta com o sítio ativo da enzima de humanos (Figura 6.7 (b)). Outra cavidade localizada mais próxima do sítio ativo da proteína, definida como S2 (azul, na Figura 6.7 (a)), também foi encontrada. O sítio S2 encontra-se na trajetória pela qual ocorre à entrada dos substratos no sítio ativo durante a catálise e, desta forma, se mostra uma região bastante promissora para o planejamento molecular de inibidores. Além disso, a formação de tal bolsão é definida pela alça composta pelos resíduos Leu128 a Ala140, a qual desempenha um papel fundamental durante a catálise.²⁶ Devido à alta flexibilidade desta região (evidenciada pelos valores altos do fator de temperatura, b_{factor}), ocorrem variações conformacionais intensas que fazem a alça funcionar basicamente como uma porta de acesso que pode abrir e fechar para viabilizar a entrada e saída das moléculas envolvidas na catálise de dentro região S1.

Mais importante ainda, é o fato de que a mesma análise, feita para enzima humana, evidencia diferenças significativas entre as mesmas regiões nas enzimas TcDHODH e HsDHODH. A Figura 6.7 (b) ilustra os resultados encontrados a partir do programa SiteID quando analisada a estrutura 2FPV. Para facilitar a comparação das duas estruturas foram alinhadas com base nos $C\alpha$ dos resíduos de aminoácidos.

Quando comparamos as representações (a) e (b) da Figura 6.7, percebermos que o sítio S2 não é encontrado na estrutura da proteína HsDHODH. Pode-se imaginar esta região como uma extensão de S1 com características totalmente distintas entre as duas proteínas. Isto, evidentemente, abre um espectro de possibilidades muito amplo para o planejamento de inibidores seletivos à enzima TcDHODH, para uma região nunca antes explorada.

A região S3, encontrada pelo programa SiteID, também se mostra bastante interessante, pois situa-se em uma cavidade localizada atrás do sítio S2. É razoável supor que esta fissura seja necessária para permitir a abertura sítio S2 para que o substrato tenha acesso ao sítio S1. Esta hipótese é suportada por estudos que mostram o papel essencial do resíduo Lys214, localizado nesta região, para a estabilidade estrutural da alça $\alpha4$ - βA . A mutação sítio dirigida deste resíduo por uma Cisteína na estrutura da proteína DHODH de *Lactococcus lactis*, resultou na completa desestruturação da alça e concomitante perda de atividade pela enzima.²⁷

Em todos os modelos cristalográficos da enzima TcDHODH analisados, somente o estado fechado da alça foi observado. De fato, é possível verificar que a interação da Lys136 com o átomo de oxigênio carbonílico da Leu101 funciona como uma “*fechadura molecular*”, estabilizando o estado fechado. Além disso, o arranjo cristalino da TcDHODH também pode favorecer este estado.

A cristalização da enzima TcDHODH, geralmente é feita na presença de glicerol. É frequente observar que esta molécula ocupa a cavidade definida como sítio S4 na Figura 6.7.

A comparação entre as cavidades S3 (TcDHODH) e S3' (HsDHODH), sugere uma semelhança entre a mesma região das duas enzimas. Porém, é factível pensar em S4 como uma extensão do sítio S3 formando um único sítio que envolve também os resíduos da interface entre os dois monômeros que constituem a enzima TcDHODH. Em tese, um ligante capaz de interagir conjuntamente em S3 e S4 impedirá a movimentação da alça ativa, evitando que ela se abra para a entrada do substrato, atuando através de um mecanismo não-competitivo. Além disso, a seletividade é uma consequência inerente ao próprio sítio, pois desde que a enzima HsDHODH é monomérica, não há formação de interface entre dímeros e, por tanto, nem a formação da cavidade S4.

Estudos mostraram a importância da estrutura dimérica para a atividade das enzimas da Família 1A,²⁸ refletindo diretamente a importância dos resíduos desta interface para a dimerização da proteína, tais como os que dão forma a cavidade S5. A cavidade S5 é constituída por resíduos altamente conservados entre os membros da Classe 1A de enzimas DHODH e, apesar de não ter uma relação direta com o sítio catalítico, também é suposto estar envolvida na sinalização entre os dois monômeros para o processo de catálise. Assim, também pode ser explorada no planejamento de inibidores da enzima TcDHODH.²⁹

6.2.4. Coleção de compostos e ensaio virtual

Tendo em vista o interesse na busca por inibidores competitivos e potencialmente seletivos da enzima TcDHODH, os resultados obtidos através da busca por novas cavidades foram utilizados para o estabelecimento da estratégia a ser empregada na seleção de compostos a serem avaliados *in vitro* contra a enzima. Dentre as várias regiões identificadas como sítios passíveis de acomodar compostos

capazes de modular atividade da TcDHODH, decidiu-se focar nos sítios S1 e S2. Esta escolha foi feita pelo fato de o sítio S2 poder ser utilizado como uma extensão do sítio ativo e também devido às diferenças significativas desta região nas enzimas de *T. cruzi* e humanos. Assim, de acordo com essas hipóteses, seria possível a acomodação de moléculas maiores e que interagissem seletivamente com o sítio ativo da enzima TcDHODH.

Como discutido anteriormente, o sítio ativo da enzima (S1) se caracteriza pela presença de vários resíduos capazes de interagir através ligações de hidrogênio com os substratos. A rede de interações formada com a molécula de ORO sugere que as mesmas sejam importantes para o seu reconhecimento molecular. Assim, com o objetivo de avaliar apenas se o sítio S1 seria capaz de acomodar ligantes que se estendessem na direção do sítio S2, decidiu-se buscar por compostos que mantivessem o esqueleto do substrato, mas que fossem substituídos em posições que possibilitassem a validação dessa proposta. Uma análise do complexo ORO-TcDHODH (2E6F), representado esquematicamente na Figura 6.8, sugere que as posições mais prováveis para extensão do composto na direção de S2, sem prejuízo para as interações já existentes, seria no C₅ do anel pirimidinona ou no oxigênio carboxílico.

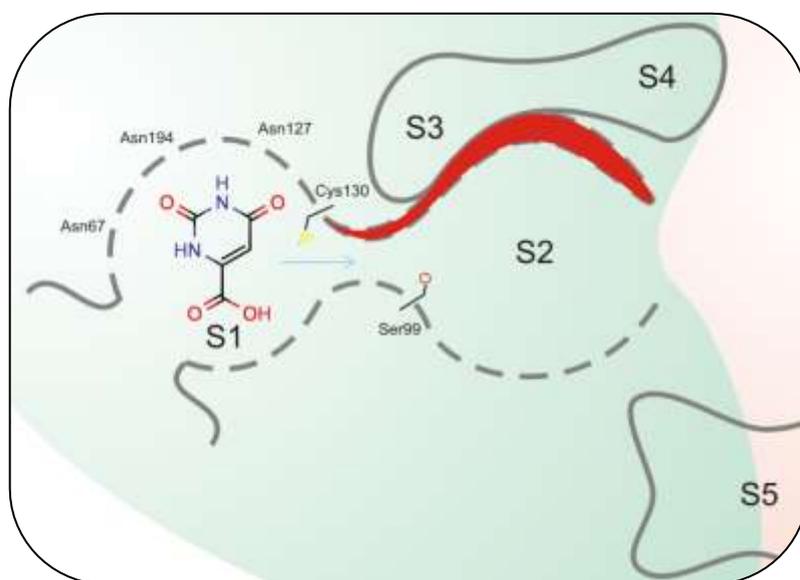


Figura 6.8 - Representação esquemática das posições relativas entre a molécula de ORO e os sítios de interação encontrados pelo programa SiteID. As linhas cheias e pontilhadas indicam cavidades expostas e não-expostas ao solvente, respectivamente; a alça ativa (α 4-Ba) está indicada em vermelho.

Com base nessas ideias, foram feitas buscas por moléculas em coleções virtuais de compostos comercialmente disponíveis, que continham substituintes nas

posições previamente definidas através das análises estruturais. Após uma extensa busca por subestruturas no banco de dados do ZINC com o programa Filter, e utilizando as ferramentas de buscas disponíveis nos bancos de *dados Scifinder Scholar e Emolecules*, cerca de 100 moléculas foram selecionadas para a docagem molecular. Por se tratar apenas de um ensaio inicial, alguns esqueletos contendo modificações em outras posições além do C₅ e do oxigênio carboxílico do ORO também foram selecionados. Em seguida, novamente o programa de docagem molecular Autodock foi escolhido para a avaliação da coleção contendo os compostos encontrados através das buscas por subestruturas.

Levando-se em consideração que os ligantes contendo substituintes mais volumosos no C₅ do anel ou no grupo carboxila do ORO devem provocar mudanças conformacionais nos resíduos de aminoácidos ao redor que não são induzidas por nenhum ligante já cristalizado com a enzima TcDHODH, pode-se imaginar que a docagem dos compostos selecionados, mantendo-se todos os resíduos na posição da estrutura cristalográfica, pode levar a predições incorretas das energias de interação devido a contatos estéreis bastante desfavoráveis. Na tentativa de minimizar este problema os resíduos Ser99, Cys130 e Leu71 foram definidos como flexíveis durante o processo de docagem. O movimento das cadeias laterais desses resíduos poderia, pelo menos em parte, propiciar uma melhor acomodação dos substituintes mais volumosos, levando a uma solução um pouco mais razoável para o problema.

6.2.5. Seleção dos compostos e ligantes identificados

Analogamente às análises feitas para seleção dos compostos testados contra a TcGAPDH, 33 moléculas com perfis de agrupamento das poses e energias livre de interação (ΔG_{int}) adequadas foram selecionadas para análise visual. Em seguida o ΔG_{int} mais favorável do maior grupamento de poses cada molécula foi coletado e classificado em ordem decrescente (Tabela 6.8).

Apesar de as moléculas terem mostrado bons grupamentos de poses segundo os resultados da docagem molecular, podemos observar na Tabela 6.8 que nem todas possuem um valor de ΔG_{int} comparável ao da molécula de Oxonato (em verde), a qual foi redocada no sítio da enzima para obtenção de um valor energia a ser utilizado como parâmetro de comparação. A escolha do subconjunto final de

nove compostos a serem adquiridos comercialmente (em azul) foi feita levando-se em conta tanto valores de energia quanto a diversidade química entre os 33 compostos mais bem pontuados pelo programa Autodock. Deste modo, poderíamos explorar mais amplamente o comportamento do sítio quando este interage com diferentes substituintes na posição 5 do anel pirimidinona.

Tabela 6.8 - Moléculas selecionadas através da docagem molecular juntamente com o Oxonato e valores de energia correspondentes

Composto	Fórmula Molecular	$\Delta G_{int} / \text{Kcal mol}^{-1}$	Composto	Fórmula molecular	$\Delta G_{int} / \text{Kcal mol}^{-1}$
1	C ₄ H ₅ N ₃ O ₅ S	-14,54	17	C ₁₄ H ₁₉ N ₃ O ₅	-11,15
2	C ₆ H ₆ N ₂ O ₄	-13,85	18	C ₆ H ₆ N ₂ O ₄	-10,92
3	C ₅ H ₃ N ₃ O ₆	-13,58	19	C ₅ H ₂ C ₁ F ₃ N ₂ O ₂	-10,26
4	C ₅ H ₃ N ₃ O ₆	-13,58	20	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₅	-10,22
Oxonato	C ₄ H ₅ N ₃ O ₄	-13,42	21	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₄	-10,22
5	C ₅ H ₃ C ₁ N ₂ O ₄	-13,39	22	C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₅	-9,81
6	C ₅ H ₃ FN ₂ O ₄	-12,97	23	C ₁₁ H ₁₅ C ₁ N ₃ O ₄	-9,53
7	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ O ₇ S	-12,82	24	C ₅ H ₃ IN ₂ O ₄	-9,46
8	C ₆ H ₅ N ₂ O ₅	-12,8	25	C ₁₃ H ₁₁ N ₃ O ₅	-9,24
9	C ₅ H ₅ N ₃ O ₃	-12,75	26	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₄	-9,01
10	C ₈ H ₁₁ N ₃ O ₄	-12,33	27	C ₅ H ₃ N ₂ O ₃ S	-8,94
11	C ₅ H ₅ N ₃ O ₄	-12,28	28	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₅	-8,77
12	C ₁₃ H ₁₀ C ₁ N ₃ O ₅	-12,16	29	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₇	-8,76
13	C ₅ H ₄ N ₂ O ₃ S	-12,05	30	C ₁₄ H ₁₁ N ₅ O ₅ S	-8,74
14	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₇	-12,04	31	C ₅ H ₃ BrN ₂ O ₄	-8,49
15	C ₆ H ₂ F ₃ N ₃ O ₂	-11,6	32	C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₄	-8,32
16	C ₆ H ₄ N ₂ O ₄	-11,26	33	C ₉ H ₁₃ N ₃ O ₄	-7,37

A Figura 6.9 mostra as estruturas moleculares de cinco compostos selecionados através desta análise, que foram adquiridos comercialmente e testados contra a enzima TcDHODH. Como pode-se observar, as moléculas possuem substituintes com características químicas relativamente distintas. No composto 6, o hidrogênio do ORO é substituído pelo flúor, bioisótero do átomo de hidrogênio capaz de promover um efeito indutivo bem maior; no composto 11 o grupo amina representa grupos doadores ou aceitadores de ligação de hidrogênio; no composto 3 o substituinte é um grupo nitro, aceitador fraco de ligação de hidrogênio porém mais volumoso que a amina; no composto 21, um grupamento hidrofóbico ligado ao oxigênio carboxílico, para avaliar a possibilidade de substituição em outra região da

molécula; e por último o grupo metil-dimetilamina, bem mais volumoso que os demais substituintes.

Apesar de as moléculas mostradas terem sido selecionadas segundo os resultados da docagem molecular, nem todas possuem um valor de ΔG_{int} comparável ao da molécula de Oxonato (em verde).

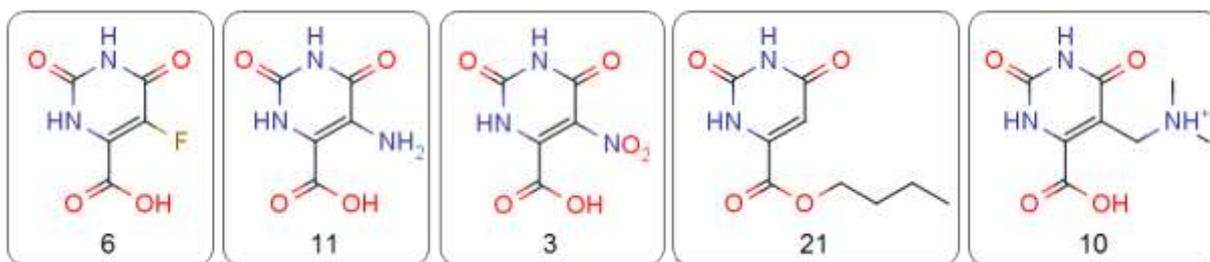


Figura 6.9 - Cinco dos nove compostos selecionados através da docagem molecular para o teste *in vitro*. A numeração dos compostos segue a mesma da Tabela 6.8

O ensaio contra a enzima mostrou que, dos nove compostos testados, cinco exibem potência (IC_{50}) em concentrações inferiores a 150 μM . Entre eles, os compostos 6, 11, 3 e 21 da Tabela 6.8, os quais estão representados na Figura 6.9 na mesma ordem das suas potências (do mais potente para o menos potente). O composto 10 apresentou potência superior a 150 μM , entretanto, é mostrado na Figura 6.9 para ilustrar as discussões que sequeem.

Numa primeira análise estes resultados sugerem que a cavidade do sítio S1 não é grande o bastante para acomodar ligantes com substituintes que crescem na direção do sítio S2. A evidência para confirmação de que isto não ocorre, só foi possível através da resolução da estrutura cristalográfica de Raios-X dos complexos entre a estrutura da enzima DHODH de *Leishmania major* (LmDHODH), que possui 100 % de identidade dos resíduos do sítio catalítico com a TcDHODH, com os compostos 3 e 11, através da colaboração com a profa. Dra. Maria C. Nonato do Laboratório de Cristalografia de Proteínas-LCP (FCFRP-USP).

Na Tabela 6.9 são mostrados os parâmetros obtidos para os modelos dos complexos entre a enzima LmDHODH e esses dois compostos. Com base nesses dados, pode-se dizer que ambos os modelos possuem bons conjuntos de parâmetros estruturais e podem ser considerados confiáveis para análises e obtenção de informações sobre o modo de interação dos ligantes com a proteína.

Tabela 6.9 - Parâmetros cristalográficos obtidos para as estruturas dos complexos dos compostos 3 e 11 com a enzima LmDHODH

Código	Resolução (Å)	R _{factor}	R _{free}	(R _{free} - R _{factor})	Ligante
A1-LmDHODH	2,10	0,18	0,23	0,05	11
A5-LmDHODH	1,96	0,16	0,20	0,04	3

A análise estrutural do complexo revela que o sítio ativo da enzima é, de fato, capaz de acomodar substituintes mais volumosos na região sendo explorada. Além disso também possibilita inferir que a razão para que o composto que contém grupo amino (11) seja pelo menos duas vezes mais potente que o composto contendo o grupo nitro (3), não é devido à diferença entre os volumes dos substituintes, e sim devido à diferença entre as interações destes dois grupos com o sítio. A Figura 6.10 mostra os mapas bidimensionais das interações de ambos os compostos com os resíduos do sítio da LmDHODH. Podemos observar que o composto 11 (Figura 6.10 (b)) tem a vantagem de ser capaz de interagir com os resíduos Ser100 e Cys129 (N α), que correspondem aos resíduos Ser99 e Cys130 na TcDHODH, através de uma ligação de hidrogênio coordenada por uma molécula d'água. Já o compostos 3, não é capaz interagir do mesmo modo que o composto 11. Isto evidencia a provável razão para a diferença de potência entre os dois compostos

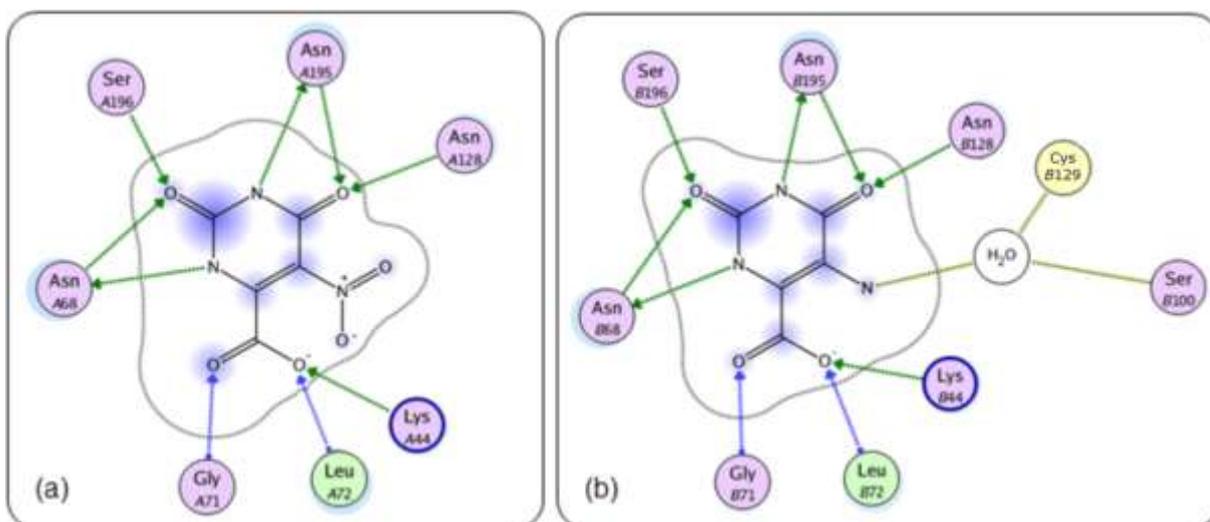


Figura 6.10 - Mapa de interações dos compostos (a) 3 e (b) 11 com o sítio ativo da LmDHODH

A interação do ligante com o resíduo Ser100, mesmo que coordenada através de uma molécula d'água, traz uma informação relevante para o planejamento de uma nova serie de compostos. Este resíduo está localizado numa região mais

externa ao sítio S1 em direção a S2 e, deste modo, é plausível imaginar que um ligante com substituinte mais longo com possibilidade alcançar uma interação com a Serina, tenha uma afinidade maior pelo sítio da enzima e passe a explorar regiões capazes de conferir seletividade à mesma frente à TcDHODH.

A disponibilidade dos dados estruturais dos complexos ajuda entender a possível razão para a diferença de potência entre os compostos 3 e 11, e ainda sugere um provável motivo para o composto que contém o átomo de flúor como substituinte (6) ser 4 vezes mais potente que composto 11. Uma minimização da Cys130 utilizando a pose predita pelo programa Autodock, através do programa Qsite³⁰, posicionou o hidrogênio da Cisteína a uma distância de 1,667 Å do átomo de flúor do composto 6. Isto sugere uma interação por ligação de hidrogênio bastante forte entre a Cys130 e o composto 6, que deve resultar na diferença de atividade frente ao composto 11.

Os resultados obtidos nesta etapa levaram ao estabelecimento de um novo ciclo de seleção e teste de compostos. Desta vez, a busca foi feita com o objetivo de selecionar compostos capazes de adotar a posição da molécula d'água que coordena a ligação de hidrogênio na interação do composto 11 com os resíduos Ser99 e Cys130. Compostos com essa característica devem possuir substituintes mais longos que os avaliados na primeira etapa e, portanto, são capazes de provocar modificações conformacionais mais intensas dos resíduos do sítio explorado. Por esse motivo, foi escolhido um protocolo de docagem que leva em consideração não só a flexibilidade das cadeias laterais de aminoácidos, mas também do esqueleto da proteína, chamado docagem com ajuste induzido.

6.2.6. Docagem com ajuste induzido

Nos métodos clássicos a docagem é feita a simulação da interação do ligante (não-rígido) com o receptor (rígido). Entretanto, ao assumir que o receptor é rígido, muitas informações a respeito da interação são perdidas, principalmente em sistemas em que há a presença de regiões com alta flexibilidade, como no caso da alça ativa presente na TcDHODH. Quando imaginamos um sistema no qual tanto a flexibilidade do ligante quanto a do receptor é considerada, tomamos um caminho para uma descrição mais próxima da dinâmica existente durante a interação intermolecular.

A utilização de estruturas cristalográficas de complexos ligante-receptor para estudos de docagem molecular limita-se a descrever o sistema de forma estática, ou seja, as conformações dos resíduos em um determinado e curto espaço de tempo interagindo com um determinado ligante. De certa forma, para estudos de docagem molecular, é mais coerente utilizar estruturas cristalográficas de receptores na forma holo do que na forma apo, já que no primeiro caso, embora estática, a estrutura cristalográfica nos dá uma noção das posições adotadas pelos resíduos na presença do inibidor (ou substrato). Entretanto, também é fato que as posições podem mudar muito quando um inibidor diferente se aproxima da mesma região. Esta mudança torna-se mais pronunciada à medida que a similaridade estrutural dos ligantes diminui.

A necessidade do planejamento de inibidores com substituintes que exploram regiões distintas das quais todos os inibidores cristalizados com a enzima TcDHODH deslocam, faz com que seja mais apropriado a utilização de um método que possa simular o ajuste dos resíduos à forma molecular desses novos ligantes. Desta forma, nesta etapa do trabalho adotou-se o protocolo de docagem desenvolvido e validado pela empresa Schrödinger® chamado *docagem com ajuste induzido* (do inglês, *Induced Fit Docking* - IFD). Basicamente, o IFD consiste de ciclos de docagens utilizando-se o programa Glide, seguidos de pequenas otimizações conformacionais utilizando-se o programa Prime ao final de cada ciclo, para redução de contatos desfavoráveis e otimização de interações direcionais, tal como doação e aceitação de ligação de hidrogênio.³¹

Primeiramente, foi efetuada a docagem dos compostos mais potentes obtidos na primeira avaliação *in vitro* (5-fluoroorotato e 5-aminoototato, mostrados nas Figura 6.11 (a) e (b), respectivamente) no sítio ativo da enzima TcDHODH, utilizando-se o protocolo IFD para obtenção dos valores de referências de energias usados como corte na seleção de novos compostos.

Como critério de escolha das poses encontradas pelo algoritmo de busca do programa, os parâmetros foram ajustados para que apenas poses nas quais as moléculas docadas pudessem interagir com o resíduo de Asn194, através da doação de ligação de hidrogênio, fossem mantidas para próximo ciclo. Os parâmetros foram configurados de modo que durante o primeiro ciclo da redocagem, os resíduos Leu71 e Cys130 fossem removidos. Esta configuração é uma maneira

de se evitar contatos desfavoráveis entre o ligante sendo docado e as cadeias laterais dos resíduos selecionados, os quais podem impedir que o ligante adote uma pose de baixa energia (mais negativa). Estes resíduos são automaticamente recolocados após a docagem e minimizados na presença do ligante.

As poses adotadas pelas moléculas dentro do sítio ativo da enzima foram consistentes (Figura 6.11 (a) e (b)) e os valores de energia foram bastante próximos, $-12,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para o composto 5-fluoroorotato e $-11,7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ para o 5-aminoorotato. Analisando-se Figura 6.11 pode-se notar a mudança de conformação da cadeia lateral da Cys130 para acomodar o ligante contento o grupo amino; entretanto, observa-se que a função de pontuação não é capaz de prever a interação de hidrogênio entre da Cys130 e o átomo de flúor do ligante, a qual foi confirmada tratando-se a Cisteína com método de Mecânica Quântica no programa Qsite.

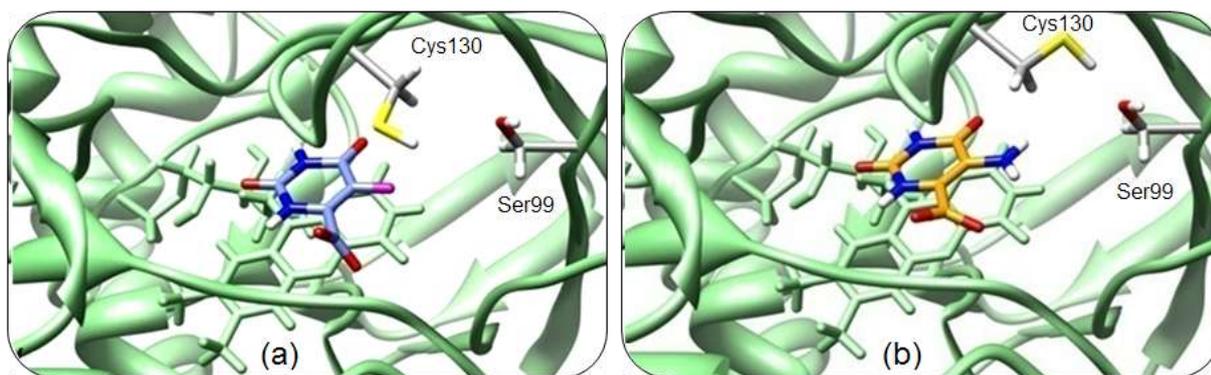


Figura 6.11 - Docagem molecular com ajuste induzido no sítio ativo da enzima TcDHODH. (a) molécula 5-fluoroorotato em azul; (b) molécula 5-aminoorotato em laranja

Em seguida, através da busca interativa em bancos de dados de moléculas comercialmente disponíveis, foram selecionados cerca de 100 compostos contendo substituintes com cadeias mais longas que os compostos testados previamente e, que em tese, pudessem se estender ao longo da cavidade S2. Porém, nenhuma das moléculas comercialmente disponíveis que mantivesse o substituinte carboxílico na posição 6 do anel (como o DHO, Oxonato ou 5-aminoorotato, por exemplo) foi encontrada. Na grande maioria das moléculas a carboxila é substituída por grupo metila, hidroxila ou oxigênio carbonílico. Alguns exemplos dos compostos encontrados e selecionados para docagem são mostrados na Figura 6.12.

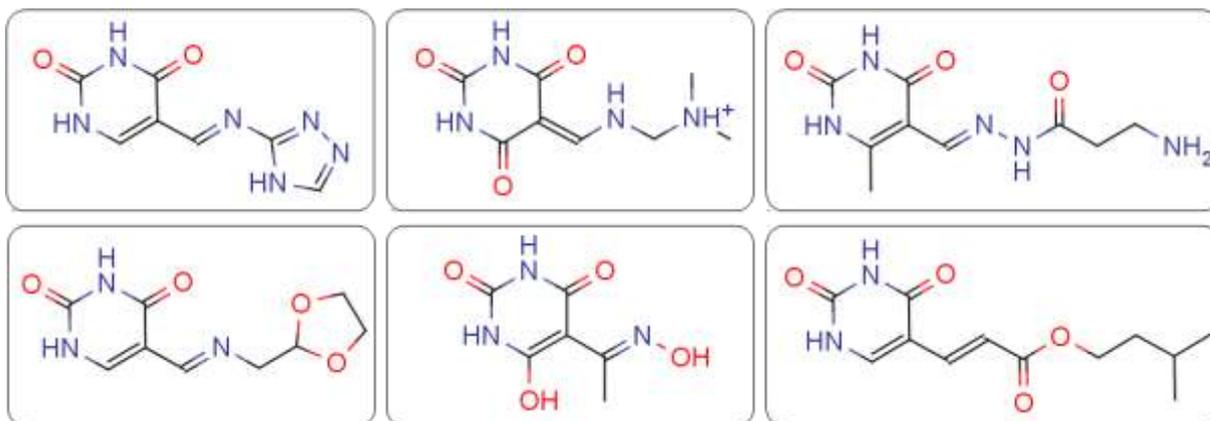


Figura 6.12 - Exemplos de moléculas com diferentes substituintes no anel pirimidinona selecionados para o Ensaio Virtual utilizando o IFD

Uma vez docada a série de moléculas, a energia da pose mais bem pontuada de cada composto foi comparada às energias dos ligantes, 5-aminoorotato e 5-fluoroorotato, previamente docados utilizando o IFD. Então, cada um dos complexos dos compostos com a TcDHODH foi visualmente inspecionado para a seleção dos compostos que apresentaram melhor complementaridade com a região próxima ao resíduo Ser99, energias de interação comparáveis aos do ligantes ativos e que fossem consistentes com as hipóteses previamente estabelecidas. Ao final, 15 compostos foram selecionados para um novo ensaio *in vitro* contra a enzima TcDHODH.

As estruturas moleculares dos complexos preditos utilizando o IFD que mostraram os melhores perfis, segundo os critérios de análise escolhidos para a seleção dos 15 compostos, são mostradas na Figura 6.13.

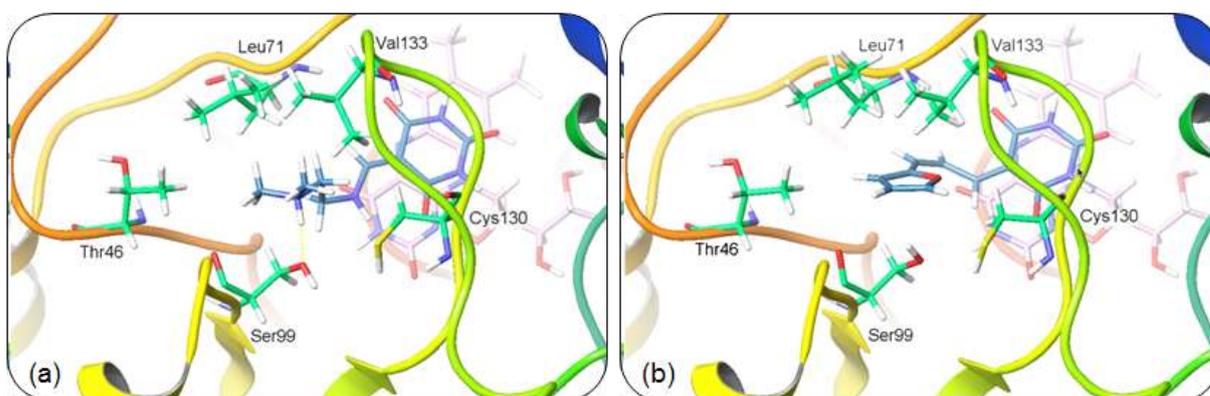


Figura 6.13 - Poses adotadas pelas duas moléculas com melhor perfil de interações entre os compostos selecionados para ensaio *in vitro* após a docagem com ajuste induzido. Moléculas selecionadas em azul; FMN na cor rosa e resíduos importantes em verde com indicação do código

Como podemos observar, a pirimidinona mostrada na Figura 6.13 (a) possui um grupamento de amina terciária que possibilita a interação através da doação de ligação de hidrogênio com a Ser99, a qual foi proposta como uma das hipóteses passíveis de serem exploradas para a extensão ao sítio S2. Além disso, a presença de resíduos hidrofóbicos, tais como a Leu71, Val133, Cys130 e a metila da Thr46 (verde), na região que separa a cavidade S1 da S2, acomoda bem as metilas ligadas à amina terciária da molécula, através de interações não-polares.

O outro composto com ótimo perfil de interações moleculares selecionado para o ensaio *in vitro* é mostrado na Figura 6.13 (b). Apesar de não fazer ligação de hidrogênio com a Ser99, a molécula desloca todos os demais resíduos hidrofóbicos com os quais interage a molécula mostrada Figura 6.13 (a). A ligação dupla conjugada que deixa o anel pirimidinona obriga a permanência dos dois primeiros carbonos no mesmo plano do anel e diminui ligeiramente o número de átomos conectando os dois anéis, o que se mostra favorável nesta região que tem a forma de um duto. Estas características preenchem muito bem um dos requerimentos estabelecidos com base nas hipóteses geradas com o teste do composto 10, mostrado na Figura 6.9, pois é provável que a baixa afinidade exibida por este composto seja, em grande parte, uma consequência da saída abrupta do átomo de nitrogênio do plano do anel logo após o primeiro átomo de carbono do substituinte, o que pode causar contatos estéricos desfavoráveis com a Cys130. Desta forma, isto sugere que as ligações que deixam o anel pirimidínico na posição 5 devem se manter no plano por pelo menos 3 Å para que o substituinte possa se posicionar numa direção apropriada para a extensão ao longo do sítio S2.

Os ensaios *in vitro* contra a enzima TcDHODH revelaram que 10 dos 15 compostos testados possuem afinidade pela enzima em concentrações entre 30 e 200 µM e, para validar ainda mais as estratégias utilizadas na seleção de inibidores da enzima TcDHODH, um composto com K_i igual a 124 nM também foi identificado (estrutura não mostrada), totalizando 11 compostos ativos nesta segunda etapa de planejamento.

Na Figura 6.14 são mostrados os esqueletos representativos dos dois compostos mais potentes encontrados nesta segunda etapa de planejamento. Uma análise das estruturas desses compostos e de suas poses previstas através da

docagem com IFD provê algumas informações úteis para o entendimento das prováveis razões para a atividade biológica exibida pelos mesmos.

Apesar das diferenças entre os grupamentos R e R', os valores das afinidades preditas através de docagem molecular com ajuste induzido colocam os compostos mostrados na Figura 6.14 no mesmo patamar energético. Entretanto, observa-se experimentalmente que o composto **b** possui uma afinidade pela enzima TcDHODH aproximadamente quatrocentas vezes maior que o composto **a**. Uma possível explicação para este fato pode estar relacionada a diferentes formas tautoméricas que ambas as moléculas podem assumir e os diferentes efeitos, em termos de reconhecimento molecular, que este fenômeno provoca quando cada composto interage com o alvo.

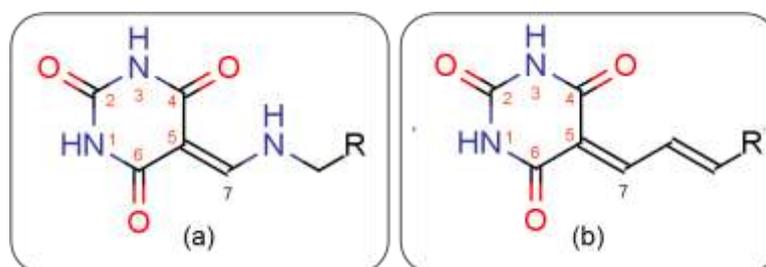


Figura 6.14 - Esqueletos representativos dos compostos mais potentes identificados

Análises estruturais do sítio ativo da enzima TcDHODH sugerem a necessidade carbono-5 no esqueleto de pirimidinona (Figura 6.15) ser insaturado. Assim, o carbono-7 permanece no plano do anel e isso posiciona o substituinte na direção do sítio S2, evitando contatos desfavoráveis com a Cisteína catalítica (Cis130) e favorecendo a acomodação de moléculas mais volumosas pela enzima.

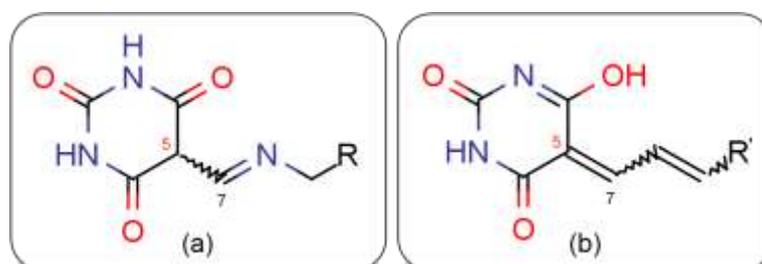


Figura 6.15 - Exemplos de formas tautoméricas adotadas pelos inibidores mais potentes contra a enzima TcDHODH

Quando enumeramos todas as formas tautoméricas adotadas pelos compostos da Figura 6.14, percebemos que das quinze estruturas possíveis para composto **a**, em cinco delas o carbono-7 pode se posicionar fora do plano do anel

(e.g. Figura 6.15 (a)), ou seja, estes tautômeros não seguem o perfil estrutural esperado para uma boa complementaridade com o sítio da TcDHODH. Por outro lado, das dez formas tautoméricas do composto **b**, nenhuma possui isomeria no carbono-5 (e.g. Figura 6.15 (b)), o que permite que este composto sempre preencha o requisito estrutural independentemente da forma tautomérica adotada. Tendo em vista que as proteínas tendem a interagir com as formas tautoméricas menos populosas em solução,³² este pode ser um dos fatores que contribui para a diferença entre as afinidades dos compostos da Figura 6.14.

Em casos onde há a necessidade da interação do sítio com uma determinada forma tautomérica para o reconhecimento molecular, pode ser necessário a inserção de grupos funcionais ou modificações no esqueleto molecular para otimização da potência dos ligantes, mas para isso, deve-se conhecer os requerimentos essenciais para a atividade e qual a forma tautomérica deve ser privilegiada. Neste caso, a disponibilidade da informação estrutural do complexo pode contribuir enormemente para o estabelecimento das modificações em posições adequadas.

Outra diferença marcante entre as estruturas mostradas na Figura 6.14, é a presença de uma conjugação de elétrons- π ao longo do substituinte no composto **b**. De acordo com a estrutura do complexo predita através do IFD, esta região está posicionada muito próxima da Cys130. Estudos envolvendo interação de elétrons- π com átomos de enxofre têm demonstrado a importância deste tipo de interação e,³³ dos compostos avaliados, somente o mais potente possui este tipo de substituinte. Este fato sugere que esta interação pode ser essencial para a alta afinidade exibida pelo composto **b**.

Quando analisamos a qualidade dos ligantes da TcDHODH em termo de suas Eficiências do ligante, pode-se dizer que o processo de otimização que levou à identificação do compostos **b** foi realizado com grande sucesso. A eficiência do ligante do composto mais potente identificado na primeira serie de inibidores, o 5-fluoroorotato, é igual a $0,56 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$ e mesmo com aumento considerável do peso molecular para a obtenção do composto **b**, a LE praticamente se manteve, pois este composto possui uma LE de $0,55 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$. Estes valores são geralmente encontrados para fragmentos moleculares com altas Eficiências do ligante (elipsoide verde na Figura 5.3) com enorme potencial como compostos

líderes. Deste modo, estes compostos caracterizam ótimos pontos de partida para obtenção de novos agentes tripanocidas.

6.3. Conclusões

Devido ao grande potencial da enzima TcDHODH como alvo para agentes tripanocidas, parte dos objetivos deste trabalho teve como foco a busca por inibidores capazes de modular a atividade desta enzima. A busca por cavidades alternativas para interação de pequenas moléculas, feita através no mapeamento da estrutura 3D da enzima, possibilitou o estabelecimento de várias regiões potencialmente exploráveis para o planejamento de inibidores. Destas, somente os sítios S1 e S2 foram utilizadas com sucesso na seleção de 25 compostos utilizando métodos em Quiminformática e de modelagem molecular. Assim, as demais cavidades identificadas podem ser exploradas e validadas e estudos posteriores.

Ótimos resultados foram obtidos através da definição apropriada da estratégia adotada para a busca de inibidores. A seleção de inibidores competitivos de alta afinidade pela TcDHODH exige a utilização de métodos de docagem que consideram não só a flexibilidade das cadeias laterais dos resíduos, como também do esqueleto polipeptídico. Neste trabalho, excelentes resultados foram alcançados através do uso do programa de docagem molecular Autodock 4.0 e, numa segunda etapa, pelo uso do protocolo de docagem com ajuste induzido. Pode-se afirmar que a utilização de SBVS que tratam os resíduos entre as cavidades S1 e S2 como estáticos são improváveis de resultar na identificação de inibidores que explorem conjuntamente estas regiões.

Várias hipóteses geradas pela sondagem do sítio com ligantes foram validadas e deram origem a novas evidências sobre as características estruturais dos ligantes necessárias para o reconhecimento molecular dos mesmos pelos sítios explorados neste trabalho. Dentre estas, a necessidade dos substituintes da posição 5 do anel pirimidínico (ou pirimidinona) permanecer no mesmo plano do anel até que este alcance regiões com menos possibilidades de contatos estéreos desfavoráveis dentro do sítio S1, e possa se estender ao longo de S2. Além disso, os resultados também sugerem a importância da conjugação no substituinte para interação do tipo

enxofre - elétrons- π e, provavelmente, para a alta afinidade exibida pelo composto com esta característica estrutural.

Mais importante do que a potência dos ligantes identificados são suas altas LE, que caracterizam estes compostos como ótimos candidatos para seguirem na gênese planejada de fármacos.

Os resultados obtidos devido à definição adequada da estratégia para a utilização dos métodos em Quiminformática refletem-se na alta taxa de acerto alcançada, Dos 24 compostos testados contra a enzima, 16 inibiram a mesma e concentrações inferiores a 200 μ M, sendo que o mais potente exibiu $K_i = 124$ nM.

O teste de uma nova serie de análogos comercialmente disponíveis também foi proposto para verificar o efeito dos diferentes grupamentos, inclusive do que contém a conjugação, para o reconhecimento molecular e afinidade exibida pelo composto mais potente identificado. Estas informações serão posteriormente utilizadas para o processo de otimização molecular destes compostos ou dos outros membros ativos da série, principalmente o composto que exibiu afinidade igual a 124 nM.

6.4. Referências

1. BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
2. PETERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
3. SITEID, version 1.0. St Louis: Tripos Inc., 2007. 1 DVD
4. IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - A free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2004.
5. FILTER, version 2.0.2. Santa Fe: OpenEye Scientific Software Inc., 2007. 1 CD-ROM
6. EMOLECULES - Chemical structure drawing search. Disponível em: <<http://www.emolecules.com>>. Acesso em 14: jan. 2010.
7. MAESTRO, version 7.5, New York: Schrödinger LCC, 2006. 1 DVD
8. HUEY, R.; MORRIS, G. M.; OLSON, A. J.; GOODSELL, D. S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of Computational Chemistry*, v. 28, n. 6, p. 1145-1152, 2007.

9. MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.
10. AUTODOCKTOOLS, version 1.4.6. La Jola: The Scripps Research Institute, 2007. 1 CD-ROM
11. GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity--a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.
12. USING autodock 4 for virtual screening. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/faqs-help/tutorial/using-autodock4-for-virtual-screening>>. Acesso em: 22 jan. 2010.
13. CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Analytical Biochemistry**, no prelo 2010.
14. CORDEIRO, A. T.; FELICIANO, P. R.; NONATO, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section F**, v. 62, n. 10, p. 1049-1051, 2006.
15. MCPHERSON, A. **Preparation and analysis of protein crystals**. New York: John Wiley, 1982. 371 p.
16. LESLIE, A.G.W. Recent changes to MOSFLM package for processing film and image plate data. **Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography**, v.26, p. 52, 1992.
17. EVANS, P. Scaling and assessment of data quality. **Acta Crystallographica Section D**, v. 62, n. 1, p. 72-82, 2006.
18. BRUNGER, A. T.; ADAMS, P. D.; CLORE, G. M.; DELANO, W. L.; GROS, P.; GROSSE-KUNSTLEVE, R. W.; JIANG, J.-S.; KUSZEWSKI, J.; NILGES, M.; PANNU, N. S.; READ, R. J.; RICE, L. M.; SIMONSON, T.; WARREN, G. L. Crystallography & NMR System: A new software suite for macromolecular structure determination. **Acta Crystallographica Section D**, v. 54, n. 5, p. 905-921, 1998.
19. VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, n. 6, p. 1022-1025, 1997.
20. MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; LEBEDEV, A.; WILSON, K. S.; DODSON, E. J. Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. **Acta Crystallographica Section D**, v. 55, n. 1, p. 247-255, 1999.
21. EMSLEY, P; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D**, v. 60, p. 2126-2132, 2004.
22. BAUMGARTNER, R.; WALLOSCHKE, M.; KRALIK, M.; GOTSCHLICH, A.; TASLER, S.; MIES, J.; LEBAN, J. Dual binding mode of a novel series of DHODH inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1239-1247, 2006.
23. GOUET, P.; COURCELLE, E.; STUART, D.; METOZ, F. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.
24. HATTOTUWAGAMA, C. K.; DAVIES, M. N.; FLOWER, D. R. Receptor-ligand binding sites and virtual screening. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1283-1304, 2006.
25. LIGPREP, version 2.0. New York: Schrödinger LCC, 2005. 1 CD-ROM

26. WOLFE, A. E.; THYMARK, M.; GATTIS, S. G.; FAGAN, R. L.; HU, Y.-C.; JOHANSSON, E.; ARENT, S.; LARSEN, S.; PALFEY, B. A. Interaction of benzoate pyrimidine analogues with class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochemistry**, v. 46, n. 19, p. 5741-5753, 2007.
27. NORAGER, S.; ARENT, S.; BJÖRNBERG, O.; OTTOSEN, M.; LEGGIO, L. L.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28812-28822, 2003.
28. ROWLAND, P.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 239-252, 1997.
29. 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, 2008.
30. QSITE, version 4.0. New York: Schrödinger LCC, 2005. 1 CD-ROM
31. SHERMAN, W.; DAY, T.; JACOBSON, M. P.; FRIESNER, R. A.; FARID, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 2, p. 534-553, 2005.
32. MARTIN, Y. Let's not forget tautomers. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**.
33. REID, K. S. C.; LINDLEY, P. F.; THORNTON, J. M. Sulphur-aromatic interactions in proteins. **FEBS Letters**, v. 190, n. 2, p. 209-213, 1985.

Capítulo 7



Conclusões e perspectivas

Neste capítulo são apresentadas as conclusões obtidas através da realização de deste trabalho e as perspectivas para o desenvolvimento futuro envolvendo os resultados encontrados no mesmo

7.1. Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que os métodos de ensaios virtuais baseados nas estruturas dos receptores (SBVS) e dos ligantes (LBVS) foram aplicados com sucesso na seleção de inibidores das enzimas Gliceraldeído-3-fostato desidrogenase e Diidroorotato desidrogenase de *Tripanossoma cruzi*. Além disso, suas utilizações também serviram para a geração de informações relevantes para o planejamento de novos inibidores destes dois alvos.

A definição das estratégias propostas para a seleção de potenciais inibidores enzimáticos, feitas com base nas informações a respeito das características estruturais de cada um dos alvos, rendeu a identificação de moléculas com características físico-químicas e estruturais similares á de compostos-líderes, que representam ótimos candidatos para otimização molecular visando o aumento da potência dos mesmos contra os respectivos alvos macromoleculares.

Os resultados dos ensaios *in vitro* serviram como validação das hipóteses geradas a partir de métodos computacionais e este fato levou à seleção de novas series de compostos para com o objetivo de verificar se as características estruturais propostas como essenciais para o reconhecimento molecular dos ligantes pelos sítios ativos das enzimas estudadas

7.2. Perspectivas

Nesta tese, a seleção de substâncias químicas ativas bioquimicamente deu-se através do emprego de métodos em Quiminformática. A validação ortogonal dar-se-á pela realização dos estudos de cristalização. Parcialmente, ela já foi conseguida para alguns inibidores da TcDHODH o que valida fundamentalmente a estratégia e confere aos compostos qualidade de inibidores verdadeiros. Por isso, atualmente estamos tentando obter cristais dos complexos dos compostos mais potentes contra as enzimas TcGAPDH e TcDHODH no Laboratório de Cristalografia de Proteínas - LPC (FCFRP-USP) através da colaboração com a Profa. Dra. Maria Cristina Nonato.

Espera-se que as informações estruturais dos compostos complexados com as enzimas forneçam informações importantes acerca dos seus modos de interações com os sítios dos respectivos alvos, e que possibilitem proposição de modificações estruturais dos compostos através da introdução de substituintes que poderão melhorar as interações com os alvos, resultando num aumento da afinidade.

Além dos estudos cristalográficos estes compostos também serão avaliados através de ensaios celulares contra as formas tripomastigota e amastigota do parasito. Estes ensaios serão feitos através da colaboração com o prof. Dr. Sergio Albuquerque da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto.

Para estudos posteriores, também será necessária a avaliação dos melhores compostos encontrados contra as proteínas ortólogas da TcGAPDH e TcDHDOH presente em humanos para verificar se são reconhecidos seletivamente pelas enzimas do parasito.

APÊNDICE A

1. Parâmetros utilizados para o programa Filter para a seleção de compostos com propriedades similares a compostos-líderes a serem priorizados para teste *in vitro* contra a TcGAPDH:

```
#This file defines the rules for Filtering multi-structure files based on
#properties and substructure patterns.
MIN_MOLWT 150 "Minimum molecular weight"
MAX_MOLWT 440 "Maximum molecular weight"
MIN_NUM_HVY 10 "Minimum number of heavy atoms"
MAX_NUM_HVY 25 "Maximum number of heavy atoms"
MIN_RING_SYS 0 "Minimum number of ring systems"
MAX_RING_SYS 3 "Maximum number of ring systems"
MIN_RING_SIZE 0 "Minimum atoms in any ring system"
MAX_RING_SIZE 20 "Maximum atoms in any ring system"
MIN_CON_NON_RING 0 "Minimum number of connected non-ring atoms"
MAX_CON_NON_RING 15 "Maximum number of connected non-ring atoms"
MIN_FCNGRP 0 "Minimum number of functional groups"
MAX_FCNGRP 12 "Maximum number of functional groups"
MIN_UNBRANCHED 0 "Minimum number of connected unbranched non-ring atoms"
MAX_UNBRANCHED 3 "Maximum number of connected unbranched non-ring atoms"
MIN_CARBONS 5 "Minimum number of carbons"
MAX_CARBONS 23 "Maximum number of carbons"
MIN_HETEROATOMS 2 "Minimum number of heteroatoms"
MAX_HETEROATOMS 12 "Maximum number of heteroatoms"
MIN_Het_C_Ratio 0.10 "Minimum heteroatom to carbon ratio"
MAX_Het_C_Ratio 1.1 "Maximum heteroatom to carbon ratio"
MIN_HALIDE_FRACTION 0.0 "Minimum Halide Fraction"
MAX_HALIDE_FRACTION 0.5 "Maximum Halide Fraction"
#count ring degrees of freedom = (#BondsInRing) - 4 - (RigidBondsInRing) -
(BondsSharedWithOtherRings)
#must be >= 0, from JCAMD 14:251-265,2000.
ADJUST_ROT_FOR_RING true "BOOLEAN for whether to estimate degrees of freedom in
rings"
MIN_ROT_BONDS 0 "Minimum number of rotatable bonds"
MAX_ROT_BONDS 10 "Maximum number of rotatable bonds"
MIN_RIGID_BONDS 0 "Minimum number of rigid bonds"
MAX_RIGID_BONDS 25 "Maximum number of rigid bonds"
MIN_HBOND_DONORS 0 "Minimum number of hydrogen-bond donors"
MAX_HBOND_DONORS 4 "Maximum number of hydrogen-bond donors"
MIN_HBOND_ACCEPTORS 0 "Minimum number of hydrogen-bond acceptors"
MAX_HBOND_ACCEPTORS 6 "Maximum number of hydrogen-bond acceptors"
MIN_LIPINSKI_DONORS 0 "Minimum number of hydrogens on O & N atoms"
MAX_LIPINSKI_DONORS 5 "Maximum number of hydrogens on O & N atoms"
MIN_LIPINSKI_ACCEPTORS 0 "Minimum number of oxygen & nitrogen atoms"
MAX_LIPINSKI_ACCEPTORS 10 "Maximum number of oxygen & nitrogen atoms"
MIN_COUNT_FORMAL_CRG 0 "Minimum number formal charges"
MAX_COUNT_FORMAL_CRG 3 "Maximum number of formal charges"
MIN_SUM_FORMAL_CRG -2 "Minimum sum of formal charges"
MAX_SUM_FORMAL_CRG 2 "Maximum sum of formal charges"
MIN_CHIRAL_CENTERS 0 "Minimum chiral centers"
MAX_CHIRAL_CENTERS 4 "Maximum chiral centers"
MIN_XLOG P -5.0 "Minimum XLog P"
MAX_XLOG P 4.0 "Maximum XLog P"
#choices are insoluble<poorly<moderately<soluble<very<highly
MIN_SOLUBILITY moderately "Minimum solubility"
PSA_USE SandP false "Count S and P as polar atoms"
MIN_2D_PSA 0.0 "Minimum 2-Dimensional (SMILES) Polar Surface Area"
MAX_2D_PSA 150.0 "Maximum 2-Dimensional (SMILES) Polar Surface Area"
AGGREGATORS true "Eliminate known aggregators"
PRED_AGG true "Eliminate predicted aggregators"
#secondary Filters (based on multiple primary Filters)
GSK_VEBER true "PSA>140 or >10 rot bonds"
MAX_LIPINSKI 1 "Maximum number of Lipinski violations"
MIN_ABS 0.5 "Minimum probability F>10% in rats"
PHARMACOPIA true "Log P > 5.88 or PSA > 131.6"
ALLOWED_ELEMENTS H,C,N,O,F,S,Cl,Br
ELIMINATE_METALS Sc,Ti,V,Cr,Mn,Fe,Co,Ni,Cu,Zn,Y,Zr,Nb,Mo,Tc,Ru,Rh,Pd,Ag,Cd
#acceptable molecules must have <= instances of each of the patterns below
#specific, undesirable functional groups
```

RULE 0 quinone
 RULE 0 pentafluorofenil_esters
 RULE 0 paranitrofenil_esters
 RULE 0 HOBT_esters
 RULE 0 triflates
 RULE 0 lawesson_s_reagent
 RULE 0 phosphoramides
 RULE 0 beta_carbonyl_quat_nitrogen
 RULE 0 acylhydrazide
 RULE 0 cation_C_Cl_I_P_or_S
 RULE 0 phosphoroyl
 RULE 0 alkyl_phosphate
 RULE 0 phosphinic_acid
 RULE 0 phosphanes
 RULE 0 phosphoranes
 RULE 0 imidoyl_chlorides
 RULE 0 nitroso
 RULE 0 N_P_S_Halides
 RULE 0 carbodiimide
 RULE 0 isonitrile
 RULE 0 triacyloxime
 RULE 0 cyanohydrins
 RULE 0 acyl_cyanides
 RULE 0 sulfonylnitrile
 RULE 0 phosphonylnitrile
 RULE 0 azocyanamides
 RULE 0 beta_azo_carbonyl
 RULE 0 polyenes
 RULE 0 saponin_derivatives
 RULE 1 cytochalasin_derivatives
 RULE 4 cycloheximide_derivatives
 RULE 1 monensin_derivatives
 RULE 1 squalestatin_derivatives
 #functional groups which often eliminate compounds from consideration
 RULE 0 acid_halide
 RULE 0 aldehyde
 RULE 0 alkyl_halide
 RULE 0 anhydride
 RULE 0 azide
 RULE 0 azo
 RULE 0 di_peptide
 RULE 0 michael_acceptor
 RULE 0 beta_halo_carbonyl
 RULE 0 nitro
 RULE 0 oxygen_cation
 RULE 0 peroxide
 RULE 0 phosphonic_acid
 RULE 0 phosphonic_ester
 RULE 0 phosphoric_acid
 RULE 0 phosphoric_ester
 RULE 0 sulfonic_acid
 RULE 0 sulfonic_ester
 RULE 0 tricarbo_phosphene
 RULE 0 epoxide
 RULE 0 sulfonyl_halide
 RULE 0 halopyrimidine
 RULE 0 perhalo_ketone
 RULE 0 aziridine
 RULE 1 oxalyl
 RULE 0 alphahalo_amine
 RULE 0 halo_amine
 RULE 0 halo_alkene
 RULE 0 acyclic_NCN
 RULE 0 acyclic_NS
 RULE 0 SCN2
 RULE 0 terminal_vinyl
 RULE 0 hetero_hetero
 RULE 0 hydrazine
 RULE 0 N_methoyl
 RULE 0 NS_beta_halothyl
 RULE 0 propiolactones
 RULE 0 nitroso
 RULE 0 iodoso
 RULE 0 iodoxy
 RULE 0 noxide
 #groups of molecules
 RULE 0 dye

```

#functional groups which are allowed, but may not be wanted in high quantities
#common functional groups
RULE 6 alcohol
RULE 4 alkene
RULE 4 amide
RULE 4 amino_acid
RULE 2 amine
RULE 4 primary_amine
RULE 4 secondary_amine
RULE 4 tertiary_amine
RULE 2 carboxilico_acid
RULE 6 halide
RULE 0 iodine
RULE 2 ketone
RULE 4 phenol
RULE 1 imine
RULE 1 metil_ketone
RULE 1 alkylaniline
RULE 4 sulfonamide
RULE 1 sulfonylurea
RULE 0 phosphonamide
RULE 0 alphahalo_ketone
RULE 0 oxaziridine
RULE 1 cyclopropyl
RULE 2 guanidine
RULE 0 sulfonimine
RULE 0 sulfinimine
RULE 1 hydroxamic_acid
RULE 0 phosphoryl_
RULE 0 sulfinylthio
RULE 0 disulfide
RULE 0 enol_ether
RULE 0 enamine
RULE 0 organometallic
RULE 0 dithioacetal
RULE 1 oxime
RULE 0 isothiocyanate
RULE 0 isocyanate
RULE 3 lactone
RULE 3 lactam
RULE 1 thioester
RULE 1 carbonate
RULE 0 carbamic_acid
RULE 1 thiocarbamate
RULE 0 triazine
RULE 1 malonic
#other functional groups
RULE 2 alkyne
RULE 4 aniline
RULE 4 aryl_halide
RULE 2 carbamate
RULE 3 ester
RULE 5 ether
RULE 1 hydrazone
RULE 0 nonacylhydrazone
RULE 1 hydroxylamine
RULE 2 nitrile
RULE 2 sulfide
RULE 2 sulfone
RULE 2 sulfoxide
RULE 1 thiourea
RULE 1 thioamide
RULE 1 thiol
RULE 2 urea
RULE 0 hemiketal
RULE 0 hemiacetal
RULE 0 ketal
RULE 1 acetal
RULE 0 aminal
RULE 0 hemiaminal
#protecting groups
RULE 0 benzyloxycarbonyl_CBZ
RULE 0 t_butoxycarbonyl_tBOC
RULE 0 fluorenylmethoxycarbonyl_Fmoc
RULE 1 dioxolane_5MR
RULE 1 dioxane_6MR
RULE 1 tetrahydropyran_THP

```

```

RULE 1 methoxyethoxymetil_MEM
RULE 2 benzyl_ether
RULE 2 t_butyl_ether
RULE 0 trimetilsilyl_TMS
RULE 0 t_butyl(dimetilsilyl)_TBDMS
RULE 0 triisopropylsilyl_TIPS
RULE 0 t_butyl(difenilsilyl)_TBDPS
RULE 1 phthalimides_PHT
RULE 2 arenesulfonyl

```

2. Parâmetros usados para geração do banco de fragmentos através do programa Makefraglib

```

#makefraglib
#Default settings
  -pvmconf : hosts.pvm

  #File Options
    -in : 6_p0.1.mol2.gz
    #-log : (no default setting)
    -out : mfl_6_p0.1.oeb.gz
    -param : makefraglib.parm
    #-prefix makefraglib
    #-skip : (no default setting)
    -verbose false

  #3D Construction Parameters
    -buildff mmff94s
    -ewindow 4.000000
    -fromCT false
    -rms 0.100000
    -startfact 20

  #PVM
    -pvmdebug false

```

3. Parâmetros usados para geração do banco de confôrmeros utilizando-seo programa Omega:

```

#Omega
#Default settings

  #File Options
    -commentEnergy false
    -in : 6_p0.1.mol2.gz
    -includeInput true
    #-log : (no default setting)
    -out : omega_6_p0.1.oeb.gz
    -param : omega.parm
    #-pendingFile : (no default setting)
    #-prefix omega2
    -rotorOffsetCompress true
    -sdEnergy false
    #-status : (no default setting)
    -verbose false
    -warts false

```

```

#3D Construction Parameters
  #-addfraglib : (no default setting)
  -buildff mmff94s
  -canonOrder true
  -deleteFixHydrogens false
  -dielectric 1.000000
  -exponent 1.000000
  #-fixfile : (no default setting)
  -fixrms 0.150000
  -fromCT false
  -maxmatch 10
  -setfraglib : mfl_6_p0.1.oeb.gz
  -umatch true

#Structure Enumeration
  -enumNitrogen false
  -enumRing false

#Torsion Driving Parameters
  #-erange : (no default setting)
  -ewindow -25.000000
  #-maxConfRange : (no default setting)
  -maxconfgen 50000
  -maxconfs 300
  -maxrot -1
  -maxtime 120.000000
  -rangeIncrement 5
  -rms 0.800000
  #-rmsrange : (no default setting)
  -searchff mmff94s
  #-torlib : (no default setting)

#PVM
  -pvmconf : hosts.pvm
  -pvmdebug false
  #-pvmlog : (no default setting)
  -pvmpass 10

```

4. Parâmetros usados para docagem molecular utilizando-se o programa Fred:

```

#Fred
#Default settings

#Execute Options
  -param : fred.parm
  -pvmconf : hosts.pvm

#Inputting Ligands
  -dbase : omega_6_p0.1.oeb.gz
  -conftest isomeric
  #-molnames : (no default setting)
  -assign_ligand_charges false

#MASC Preparation
  #-reference_receptors : (no default setting)
  -no_masc_data_calc false
  -recalculate_masc_data false
  -report_masc_failures false

#Receptor Site
  -rec : lqxs_pprep_ref.oeb.gz

```

```

#-pharm : (no default setting)
-assign_protein_charges false

#Create Site
  #-pro : lqxs_prep_ref.pdb
  -strip_water false
  #-bound_ligand : (no default setting)
  #-box : S70.mol2
  #-addbox 6.000000
  #-no_inner_contour true

#Docking

#Exhaustive Search
  -no_dock false
  -exhaustive_scoring chemgauss3
  -num_poses 200
  #-clash_scale : (no default setting)

#Optimization
  -opt chemgauss3

#Consensus Pose Selection
  -pose_select_weight_shapegauss 0
  -pose_select_weight_plp 1
  -pose_select_weight_chemgauss2 0
  -pose_select_weight_chemgauss3 1
  -pose_select_weight_chemscore 0
  -pose_select_weight_oechemscore 1
  -pose_select_weight_screenscore 0
  -pose_select_weight_cgo 0
  -pose_select_weight_cgt 0

#Force Field Refinement
  -refine no_refinement

#Scoring

#Standard Scoring Functions
  -shapegauss false
  -plp false
  -chemgauss2 false
  -chemgauss3 false
  -chemscore false
  -oechemscore false
  -screenscore false
  -cgo false
  -cgt false
  -zapbind false
  -consensus true

#MASC Corrected Scoring Functions
  -shapegauss_masc false
  -plp_masc false
  -chemgauss2_masc false
  -chemgauss3_masc false
  -chemscore_masc false
  -oechemscore_masc false
  -screenscore_masc false
  -cgo_masc false
  -cgt_masc false

```

```
-zapbind_masc false  
-consensus_masc true
```

```
#Output  
#-output_dir : (no default setting)  
#-prefix : (no default setting)  
-serial false  
-oformat oeb.gz  
-hitlist_size 1000  
-num_alt_poses 0
```