

RENATO FERREIRA DE FREITAS

**Integração de Métodos em Quiminformática e Biocalorimetria para o
Planejamento de Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-fosfato
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. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2009

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ele ter me dado a coragem e perseverança para alcançar meus objetivos.

À minha esposa Mábia, pelo amor, carinho e apoio nos momentos difíceis e pela imensa compreensão.

Aos meus pais, Cida e Carlos, pelo amor e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Maxwell e Sérgio, pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Carlos A. Montanari, pelo compromisso e suporte na resolução das dificuldades encontradas, pelo estímulo e amizade.

Aos meus grandes amigos Helton, Juliana, Josmar, Fábio, Igor, Renato Bauab, Vinícius, Geraldo, pelos momentos de discussão, pela ajuda, e acima de tudo pela amizade e pelos inesquecíveis churrascos.

A todos os membros do Grupo de Química Medicinal de Produtos Naturais (NEQUIMED-PN).

Às funcionárias da Pós-Graduação, Andréia e Silvia, por sempre apresentarem compromisso em resolver as questões burocráticas.

Ao Instituto de Química de São Carlos, pelo profissionalismo e competência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de doutorado concedida e pelo apoio financeiro durante a realização desta tese.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical que aflige milhões de pessoas, gerando consequências sócio-econômicas devastadoras. Ela tem sido considerada uma doença tropical super-negligenciada, já que os únicos fármacos disponíveis para o seu tratamento apresentam baixa eficácia e causam vários efeitos colaterais. Além disso, os mesmos foram introduzidos há mais de três décadas. Com esse cenário, é evidente a necessidade da descoberta, desenvolvimento e introdução de novos fármacos para o tratamento eficiente e seguro da doença de Chagas. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é um alvo biomacromolecular atraente para a descoberta de novos fármacos contra os tripanossomatídeos, em virtude das enzimas da via glicolítica exercerem um papel fundamental no fornecimento de energia para a sobrevivência do parasito. Essa enzima foi selecionada neste trabalho de tese para a realização de estudos em química medicinal com base em quiminformática com o objetivo de identificar potenciais inibidores enzimáticos e do *T. cruzi*. Na primeira etapa desta tese, o ensaio virtual baseado na estrutura do alvo (SBVS) foi usado na identificação e seleção dos compostos. Como resultado do planejamento *in silico*, vinte compostos foram selecionados e avaliados experimentalmente na segunda etapa do trabalho empregando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC). Destes, onze inibiram a GAPDH de *T. cruzi* resultando numa elevada taxa de acerto ($\geq 20\%$). Os novos inibidores apresentam excelente eficiência do ligante (LE), bem como mostram ligeira seletividade pela enzima do parasito. O ensaio dos inibidores contra a forma tripomastigota do *T. cruzi* identificou dois compostos capazes de inibir essa forma infectiva e um deles também mostrou ser um potente inibidor da forma amastigota do parasito, além de apresentar baixa toxidez. As duas melhores classes de inibidores da GAPDH e do parasito foram selecionadas para o estabelecimento de relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR). Estudos de QSAR 2D (HQSAR) forneceram modelos com elevada capacidade preditiva e proporcionaram a identificação de características estruturais importantes para a otimização dos ligantes a compostos-matrizes.

Palavras-chave: Doença de Chagas, Planejamento de Fármacos, Química Medicinal, Quiminformática, Calorimetria de Titulação Isotérmica.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a tropical disease, which afflicts millions of people, thus generating devastating socio-economic consequences. It has been pointed out that it is a super-neglected tropical disease, based on available drugs with low efficacy and that give rise to many side effects. In addition, these drugs were introduced three decades ago. With this scenario, it is clear the necessity of the discovery, development and introduction of new efficient drugs to treat Chagas disease. The enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a promising target for the development of new drugs against trypanosomatides, since the enzymes of the glycolytic pathway display a fundamental role in the energy supply to parasite survival. In this thesis, this enzyme was selected for medicinal chemistry within the cheminformatics framework aiming at the identification of potential enzymatic and parasite inhibitors. In the first part, structure-based virtual screening (SBVS) methods were employed in the selection and identification of compounds. Based on the *in silico* design, twenty compounds were selected and experimentally evaluated in the second part using the isothermal titration calorimetry (ITC) technique. Out of these, eleven compounds inhibited the *T. cruzi* GAPDH, resulting in high hit rates ($\geq 20\%$). The new selected inhibitors display excellent ligand efficiency (LE), as well as some selectivity for the parasite enzyme. The inhibitors assay against the trypomastigote form of *T. cruzi* was used to identify two compounds able to inhibit this infective form, and one showed to be a strong amastigote parasite inhibitor, also disclosing low cytotoxicity profile. The best two classes of GAPDH and parasite inhibitors were selected for the establishment of a quantitative structure-activity relationship (QSAR). 2D QSAR (HQSAR) studies resulted in linear models with high predictive power, amenable for the identification of important structural features in the process of hit-to-lead optimization.

Keywords: Chagas Disease, Drug Design, Medicinal Chemistry, Cheminformatics, Isothermal Titration Calorimetry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas, doença do sono e da leishmaniose... 3	3
Figura 1.2 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> 5	5
Figura 1.3- Representação das estruturas químicas dos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas..... 7	7
Figura 1.4 - Exemplos de compostos ativos contra diferentes alvos do <i>T. cruzi</i> identificados usando a estratégia “piggyback medicinal chemistry”..... 8	8
Figura 2.1 – Representação simplificada da fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicetato (1,3-BPG)..... 16	16
Figura 2.2.- Mecanismo da reação da enzima GAPDH: Após a formação do complexo enzima-substrato (1) ocorre a formação de uma ligação covalente hemitioacetal (2) entre o substrato e o grupo –SH do resíduo de cisteína, facilitada pela catálise ácido-base com uma base vizinha, a histidina (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. 17	17
Figura 2.3 - (a) Representação em fita das quatro cadeias da enzima GAPDH; (b) representação em fita dos domínios NAD ⁺ e catalítico. A figura foi gerada com o programa Chimera. 18	18
Figura 2.4 - (a) Representação bidimensional das interações entre o análogo do produto que se encontra cristalizado com a GAPDH de <i>T. cruzi</i> e os resíduos dos sítios P _s e P _i ; Sobreposição da GAPDH de <i>T. cruzi</i> (cinza claro) com: (b) GAPDH de <i>B. stearothermophilus</i> (rosa) e (c) <i>C. parvum</i> (azul). O análogo do produto na enzima do <i>T. cruzi</i> está representado como bolas e varetas. Somente os heteroátomos estão coloridos por elemento. A figura (a) foi gerada com o programa MOE, enquanto que a figura (b) e (c) foram feitas usando o programa Chimera..... 19	19
Figura 2.5 - Estruturas representativas das classes de inibidores irreversíveis da GAPDH de <i>T. cruzi</i> 21	21
Figura 2.6 - Estruturas representativas das classes de inibidores reversíveis da GAPDH de <i>T. cruzi</i> 23	23
Figura 3.1 - Os estágios da descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco..... 31	31
Figura 3.2 - Representação do espaço químico e do espaço químico-biológico. Os compostos terapeuticamente úteis se agrupam formando “galáxias”..... 34	34

Figura 3.3 - Aplicação dos métodos em quiminformática nos diferentes estágios do processo de desenvolvimento de um fármaco.....	35
Figura 3.4 - Possíveis estratégias usadas no ensaio virtual.	36
Figura 5.1 - Esquema representativo da docagem.....	42
Figura 5.2 - Representação esquemática da estratégia usada na seleção dos compostos.....	45
Figura 5.3 - Alinhamento das estruturas 1QXS e 1U8F.....	48
Figura 5.4 - Alinhamento das estruturas 1QXS (verde) e 1U8F (cinza) ilustrando os resíduos que podem ser explorados na busca de ligantes seletivos. A figura foi gerada com o programa Chimera.....	49
Figura 5.5 - (a) Representação bidimensional das interações do ligante no sítio da GAPDH de <i>T. cruzi</i> ; (b) Representação tridimensional das interações que estabilizam o ligante no sítio da GAPDH de <i>T. cruzi</i> . A figura (a) foi gerada com o programa MOE, enquanto que a figura (b) foi gerada com o programa LigandScout.....	50
Figura 5.6 - Esquema ilustrativo das várias etapas de docagem realizadas.	54
Figura 5.7 - Exemplo do processo de autoescalamiento das pontuações atribuídas por dois programas de docagem.....	56
Figura 5.8 - Exemplo de dois compostos selecionados que apresentam o padrão adequado (para o posicionamento e as interações) adotado na análise visual. A figura foi gerada com o programa LigandScout.....	58
Figura 5.9 - Estrutura dos compostos selecionados para os ensaios experimentais. * Estruturas sob sigilo.	59
Figura 6.1 - Gráfico da velocidade da reação versus a concentração do substrato para uma reação catalisada por uma enzima. Essa curva apresenta a forma de uma hipérbole retangular e obedece a equação de Michaelis-Menten, da qual é possível se determinar os valores de K_M , k_{cat} e V_{max}	67
Figura 6.2 - Representação esquemática de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC): (a) antes do início da titulação as celas de referência e amostra são mantidas na mesma temperatura. A cela de referência é mantida sempre na temperatura do experimento; (b) Durante a titulação, quando uma injeção é feita, ocorre uma variação na temperatura da cela de amostra. Com isso, há uma alteração na energia fornecida a esta cela, de modo a manter a diferença de temperatura entre as celas igual a zero.....	69
Figura 6.3 - Gráfico da potência térmica versus o tempo. A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação.	71

Figura 6.4 - Determinação da entalpia aparente da reação: (a) com o substrato na seringa e (b) com o substrato na cela.	72
Figura 6.5 - Determinação da entalpia aparente da reação. As setas indicam o início das injeções.....	77
Figura 6.6 - (a) Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH. As setas indicam a 1ª e a 11ª injeção; (b) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,97$).....	79
Figura 6.7 - Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH para determinar as constantes cinéticas do NAD^+ ; (b) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,89$).	81
Figura 7.1 - (a) Representação esquemática da inibição competitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor competitivo.....	86
Figura 7.2 - (a) Representação esquemática da inibição não-competitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor não-competitivo.....	87
Figura 7.3 - (a) Representação esquemática da inibição incompetitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor incompetitivo.....	88
Figura 7.4 - Evidência de que a enzima perde a atividade ao longo do tempo.	90
Figura 7.5 - Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores 1 e 2 . Pode-se observar nessa curva o aumento no valor de K_M aparente na presença do inibidor. Contudo, a velocidade máxima não se altera.....	93
Figura 7.6 - Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores 8 (incompetitivo) e 9 (não-competitivo).	95
Figura 7.7 - Posição adotada pelo composto 19 no sítio ativo da GAPDH. Os resíduos com que fazem interações por ligação de hidrogênio e eletrostáticas estão nomeados. As interações são estão representadas por linhas azuis tracejadas.....	97
Figura 7.8 - Análise das impressões digitais das interações ligante-enzima.....	98
Figura 7.9 - Histograma da contribuição das interações para a atividade biológica dos compostos.....	99
Figura 7.10 - Evolução do ligante a composto-matriz partindo de diferentes espaços químicos.	100
Figura 8.1 - Determinação da entalpia aparente da reação. As setas indicam o início das injeções.....	109
Figura 8.2 - (a) Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH. As setas indicam o início da 1ª e da 11ª injeção; (b) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,89$).	111

Figura 9.1 - (a) Construção do holograma molecular; (b) Desenvolvimento do modelo HQSAR.	120
Figura 9.2 - Gráfico dos valores experimentais <i>versus</i> preditos de pK_i^{ap} para os compostos do conjunto treinamento e teste.....	128
Figura 9.3 - (a) contribuição individual de cada átomo para o composto 8 ; (b) estrutura do composto 8 colorida de acordo com seus átomos: carbono (cinza); oxigênio (vermelho); nitrogênio (azul); hidrogênio (ciano); cloro (verde).....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Dados estatísticos das doenças tropicais mais negligenciadas e os fármacos usados no tratamento dessas doenças.....	4
Tabela 1.2 - Enzimas envolvidas no controle da glicólise, cuja inibição individual leva a uma redução de 50% fluxo glicolítico.	10
Tabela 5.1 - Alguns dos parâmetros usados na seleção das moléculas que tiveram seus valores padrões alterados.....	51
Tabela 5.2 - Comparativo entre a energia de interação das 1000 moléculas selecionadas pela docagem consensual e da coleção teste.....	55
Tabela 6.1 - Resultados obtidos na determinação da entalpia aparente da reação.	78
Tabela 6.2 - Constantes cinéticas calculadas para o G3P, na ausência e na presença de 5% de DMSO.....	80
Tabela 6.3 - Constantes cinéticas calculadas para o NAD ⁺ , na ausência e na presença de 5% de DMSO.....	82
Tabela 7.1 - Afinidade (K_i^{ap}) e o efeito dos inibidores competitivos nos parâmetros cinéticos (K_M , V_{max}) da reação.	92
Tabela 7.2 - Afinidade (K_i^{ap}) e o efeito dos inibidores não-competitivos (composto 9) e incompetitivos (compostos 8 , 10 e 11) nos parâmetros cinéticos (K_M , V_{max}) da reação.....	94
Tabela 7.3 - Estrutura dos compostos inativos contra a GAPDH.....	96
Tabela 7.4 - Eficiência do ligante dos inibidores da GAPDH de <i>T. cruzi</i>	101
Tabela 8.1 - Resultados obtidos na determinação da entalpia aparente da reação.	110
Tabela 8.2 - Constantes cinéticas calculadas para o G3P, na presença de 5% de DMSO.....	111
Tabela 8.3 - Valores para o K_M , k_{cat} , V_{max} , K_i^{ap} e dos inibidores avaliados contra a GAPDH de coelho.....	112
Tabela 8.4 - Seletividade dos inibidores da GAPDH de <i>T. cruzi</i> frente à enzima de coelho....	114
Tabela 8.5 - Atividade tripanocida dos inibidores da GAPDH de <i>T. cruzi</i> contra as formas infectivas tripomastigota e amastigota.....	115
Tabela 9.1 - Valores de K_i^{ap} (μM) e $\text{p}K_i^{ap}$ para os compostos do conjunto treinamento e teste.....	124

Tabela 9.2 - Resultados da análise de HQSAR usando várias distinções de fragmentos e os principais parâmetros estatísticos que indicam a qualidade do modelo. Nessa primeira análise, foi usado o tamanho padrão do fragmento (4-7).	125
Tabela 9.3 - Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando a distinção dos fragmentos do modelo 2 (ABC).	126
Tabela 9.4 - Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando a distinção dos fragmentos do modelo 7 (ABCCh).	127
Tabela 9.5 - pK_i^{ap} experimental, predito e os valores dos resíduos para os compostos do conjunto teste.	127
Tabela 9.6 - Estrutura e valores de K_i^{ap} (μM) e pK_i^{ap} para os compostos análogos do composto 8	129
Tabela 9.7 - Resultados da análise de HQSAR usando várias distinções de fragmentos e os principais parâmetros estatísticos que indicam a qualidade do modelo. Nessa primeira análise, foi usado o tamanho padrão do fragmento (4-7).	130
Tabela 9.8 - Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando a distinção dos fragmentos do modelo 8a (ABCD).	131

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Átomo
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
B	Ligação
C	Conectividade
Ch	Quiralidade
CRC <i>Check</i>	Algoritmo Cíclico de Verificação de Redundância (<i>Cyclic Redundancy Check</i>)
DA	Doador e Aceitador
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
LE	Eficiência do ligante
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	Gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
HEPES	4-(hidroxietil) piperazina ácido etanosulfônico
HQSAR	Holograma QSAR
HTS	Ensaio Automatizados em Larga Escala
IC ₅₀	Concentração Inibitória a 50%
IND	Investigação de Novo Fármaco
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}	Constante catalítica
LBDD	Planejamento baseado na estrutura do ligante
LOO	Método Deixe Um de Fora

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
PLS	Regressão Multivariada por Mínimos Quadrados Parciais
Q^2	Coefficiente de Correlação da Validação Cruzada
QSAR	Relações Quantitativas Estrutura-Atividade
R^2	Coefficiente de Correlação
RMSD	Raiz Quadrada do Desvio Médio
SBDD	Planejamento Baseado na Estrutura do Alvo
SBVS	Ensaio Virtual Baseado na Estrutura do Alvo
SEE	Erro Padrão da Estimativa
SEP	Erro Padrão da Predição
USP	Universidade de São Paulo
TEA	Trietanolamina
V	Velocidade
V_{max}	Velocidade máxima

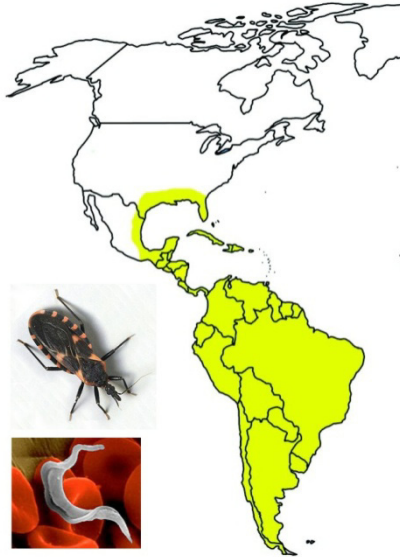
SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	2
1.1 – Doença de Chagas	2
1.1.1 – Histórico e distribuição geográfica.....	2
1.1.2 – Ciclo de vida e manifestações clínicas	4
1.1.3 – Tratamento	6
1.2 – Glicólise	9
1.3 – Referências	11
2 – GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH).....	16
2.1 – Reação e mecanismo	16
2.2 – Estrutura	17
2.3 – Inibidores.....	20
2.3.1 – Inibidores irreversíveis.....	20
2.3.2 – Inibidores reversíveis	22
2.4 – Referências	25
3 – O PAPEL DA QUÍMICA MEDICINAL NA DESCOBERTA DE FÁRMACOS	30
3.1 – Definição e objetivos.....	30
3.2 – As fases da descoberta e desenvolvimento de um fármaco.....	30
3.3 – As três principais fases da atividade de um fármaco.....	32
3.4 – A quiminformática e o planejamento de fármacos.....	33
3.4.1 – O espaço químico-biológico.....	33
3.4.2 – O ensaio virtual	35
3.5 – Referências	37
4 – OBJETIVOS	40
5 – IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS COMPOSTOS.....	42
5.1 – Planejamento baseado na estrutura do receptor	42
5.1.1 – Docagem	42
5.2 – Métodos Computacionais	45
5.3 – Resultados e Discussões.....	48
5.3.1 – Análise do sítio ativo da GAPDH	48
5.3.2 – Filtros de Seleção	50
5.3.3 – Docagem consensual	51
5.3.4 – Análise visual	57
5.4 – Referências.....	60

6 – CINÉTICA ENZIMÁTICA	65
6.1 – A Equação de Michaelis-Menten	65
6.2 – O significado de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M	67
6.2.1 – K_M	67
6.2.2 – k_{cat}	67
6.2.3 – k_{cat}/K_M	68
6.2 – Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC).....	69
6.2.1 - Calorímetro	69
6.2.2 – O uso da Técnica de ITC no Estudo da Cinética Enzimática.....	70
6.3 – Materiais.....	74
6.4 – Procedimento Experimental	74
6.4.1 – Determinação da entalpia aparente da reação catalisada pela enzima GAPDH.....	75
6.4.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima GAPDH.....	75
6.4.3 – Análise dos dados.....	76
6.5 – Resultados e Discussões.....	77
6.5.1 – Determinação da entalpia aparente da reação	77
6.5.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos para o gliceraldeído-3-fosfato (G3P).....	79
6.5.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos para a adenina nicotinamida dinucleotídeo (NAD ⁺).....	81
6.6 – Referências.....	83
7 – INIBIÇÃO ENZIMÁTICA	85
7.1 – Inibidores reversíveis	85
7.1.1 – Inibição Competitiva	85
7.1.2 – Inibição Não-competitiva.....	86
7.1.3 – Inibição Incompetitiva.....	87
7.4 – Materiais.....	89
7.5 – Procedimento Experimental	89
7.5.1 Estudos da inibição enzimática	89
7.6 – Resultados e Discussões.....	90
7.6.1 – Estudos da inibição enzimática	90
7.6.2 – Compostos ativos	91
7.6.3 – Compostos inativos	95
7.6.4 – Impressões digitais das interações.....	97
7.6.5 – Eficiência do ligante.....	99
7.7 – Referências	102
8 – SELETIVIDADE	105

8.1 – Materiais.....	106
8.2 – Procedimento Experimental	106
8.2.1 – Determinação da entalpia molar aparente da reação catalisada pela enzima GAPDH de coelho	106
8.2.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima GAPDH de coelho.....	106
8.2.3 – Estudos da inibição enzimática da GAPDH de T. cruzi e de coelho.....	107
8.2.4 – Estudos in vitro contra as formas tripomastigota e amastigota do T. cruzi.....	107
8.2.5 – Análise dos dados.....	107
8.3 – Resultados e Discussões.....	109
8.3.1 – Determinação da entalpia da reação de conversão G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato	109
8.3.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos para o gliceraldeído-3-fosfato (G3P).....	110
8.3.3 – Estudos de inibição enzimática e de seletividade.....	112
8.3.4 – Estudos de inibição das formas tripomastigota e amastigota do T. cruzi.....	114
8.4 – Referências	117
9 – RELAÇÕES QUANTITATIVAS ENTRE A ESTRUTURA-ATIVIDADE (QSAR)	119
9.1 – Holograma QSAR	120
9.2 – Procedimento.....	122
9.2.1 – Coleção de compostos	122
9.2.2 – Análise HQSAR	122
9.2.3 – Análise estatística.....	123
9.3 – Resultados e Discussões.....	124
9.3.1 – Composto 3	124
9.3.2 – Composto 8	129
9.4 – Referências	133
10 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	135
10.1 - Conclusões	135
10.2 – Perspectivas.....	138
ANEXO.....	139

Capítulo 1



Introdução

Neste capítulo é apresentada uma breve introdução sobre a doença de Chagas e o seu o panorama atual, desde a sua ocorrência geográfica, manifestações clínicas até o tratamento usado. Também é abordado o papel das enzimas da via glicolítica na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Doença de Chagas

1.1.1 – Histórico e distribuição geográfica

Os protozoários da ordem Cinetoplastida incluem o gênero *Trypanosoma*, espécies que causam algumas das doenças humanas mais negligenciadas no mundo. Existem muitas espécies de tripanossomatídeos e o grupo infecta principalmente os mamíferos. Na África subsaariana, o *Trypanosoma brucei* é o agente causador da *doença do sono* ^[1], a maior causa de morbidez e mortalidade nessa região (Figura 1.1). A organização mundial de saúde (WHO) estima que existam 300.000 pessoas infectadas e 60 milhões estejam vivendo em áreas de risco (Tabela 1.1) ^[2]. Além disso, são registradas 48.000 mortes ao ano devido aos efeitos provocados pela doença do sono. No oeste da África, essa doença é caracterizada por uma doença crônica lenta causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense*. Já na parte leste, a doença do sono é uma doença aguda causada pelo *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Ambas as doenças são fatais se permanecerem sem tratamento^[3]. Atualmente existem somente quatro fármacos aprovados para o tratamento da doença do sono. Contudo, a Eflornitina e a Pentamidina são ineficazes contra o *T. b. rhodesiense*. Nem mesmo o tratamento com o Melarsoprol (o único fármaco considerado de primeira linha) é totalmente eficaz. Quando ele é usado a doença ainda é fatal em 10% dos casos. Adicionalmente, o número de pacientes que não respondem ao tratamento com o Melarsoprol vem aumentando em virtude do aparecimento de parasitas geneticamente resistentes ao fármaco^[3].

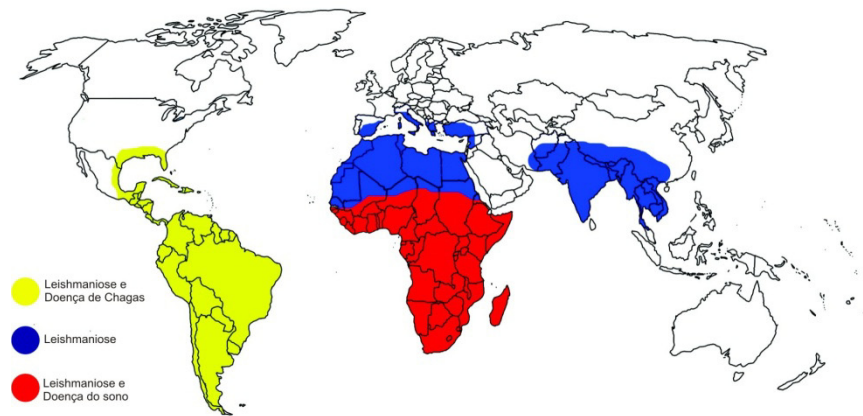


Figura 1.1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas, doença do sono e da leishmaniose^[2].

A ordem Cinetoplastida também inclui espécies do gênero *Leishmania* que causam um vasto número de doenças, entre elas a *leishmaniose*^[4,5], das quais a leishmaniose visceral é a mais severa. A sua transmissão ocorre através do “mosquito da areia”. Essa doença afeta mais de 12 milhões de pessoas e mais de 350 milhões estão em áreas de risco em 88 países (Tabela 1.1). Aproximadamente 500.000 novos casos são reportados a cada ano, embora estima-se que apenas 30% dos casos são reportados e cerca de 51.000 pessoas morrem a cada ano, vítimas da doença^[2]. A leishmaniose visceral (também conhecida como febre negra ou kala-azar na Índia) é fatal se não tratada e se localiza principalmente em países pobres do continente americano, africano e asiático (Figura 1.1). Um número significativo dos casos ocorre em crianças. Infelizmente, ainda não existe uma vacina efetiva para o tratamento da leishmaniose e a sua quimioterapia é deficiente. Os principais fármacos usados no tratamento da doença são a Miltefosina, Anfotericina B, Pentamidina e a Paromomicina^[6]. Todos são fármacos introduzidos há décadas e que necessitam ser administrados por um longo período e possuem as desvantagens de apresentarem baixa eficácia e o surgimento de parasitas resistentes.

Tabela 1.1 - Dados estatísticos das doenças tropicais mais negligenciadas e os fármacos usados no tratamento dessas doenças^[2].

Doença	Pessoas infectadas (milhões)	População em áreas de risco (milhões)	Região endêmica	Mortes (milhares)	Fármacos	Efeitos colaterais dos fármacos
Doença de Chagas	8-9	25	América latina e Caribe	14	Nifurtimox, Benzonidazol	Baixa eficácia e elevada toxidez
Doença do Sono	0,3	60	África subsaariana	48	Suramina, Pentamidina, Melarsoprol, Eflornitina	Baixa eficácia e elevada resistência
Leishmanioses	12	350	Índia, Sul da Ásia, África subsaariana, América latina e Caribe, Área Mediterrânea	51	Miltefosina, Anfotericina B, Pentamidina, Paromomicina	Baixa eficácia e elevada resistência

Na América do Sul o *Trypanosoma cruzi* é o responsável pela *doença de Chagas*^[7]. Essa doença foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 na cidade mineira de Lassance. Analisando alguns insetos, Chagas descobriu uma nova espécie de protozoário, do gênero dos tripanossomos, que foi batizado de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz. Descobriu-se mais tarde que esse parasito era o agente causador da doença de Chagas^[8].

A doença de Chagas é uma doença endêmica do continente latino-americano (Figura 1.1), embora devido à crescente imigração para áreas não endêmicas, já é possível encontrar pessoas com a doença em países como os Estados Unidos, Canadá, Espanha e Austrália. Essa doença atinge grandes áreas: acima de 25 milhões de pessoas estão em áreas de risco, enquanto 8-9 milhões de pessoas (incluindo aproximadamente 100.000 nos Estados Unidos) estão infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* (Tabela 1.1). Para completar o quadro, a cada ano estima-se que 14.000 pessoas morram devido à doença e cerca de 200.000 novos casos surgem a cada ano^[2,8-11].

1.1.2 – Ciclo de vida e manifestações clínicas

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando a forma *trypomastigota* é ingerida pelo inseto vetor (chamado de *barbeiro* no Brasil), onde se diferencia numa forma replicativa, a forma *epimastigota*. Em seguida, no intestino do parasito, ela se

desenvolve novamente para a forma tripomastigota. É nesse estágio que ocorre a contaminação do homem, ou por meio do inseto vetor (80-90% dos casos) que ocorre quando o inseto, ao picar a vítima para sugar o sangue, defeca sobre a pele da pessoa que então coça o local e assim transfere o parasito para a corrente sanguínea. Outras formas de contaminação são por transfusão sanguínea, via congênita, ou contaminação digestiva^[13]. Uma vez dentro da célula do hospedeiro há uma transformação da forma tripomastigota para a forma intracelular *amastigota*, a qual passa por várias replicações antes de se transformar novamente na forma tripomastigota, que é a responsável pela disseminação da infecção por todo o corpo (Figura 1.2)^[8,14].

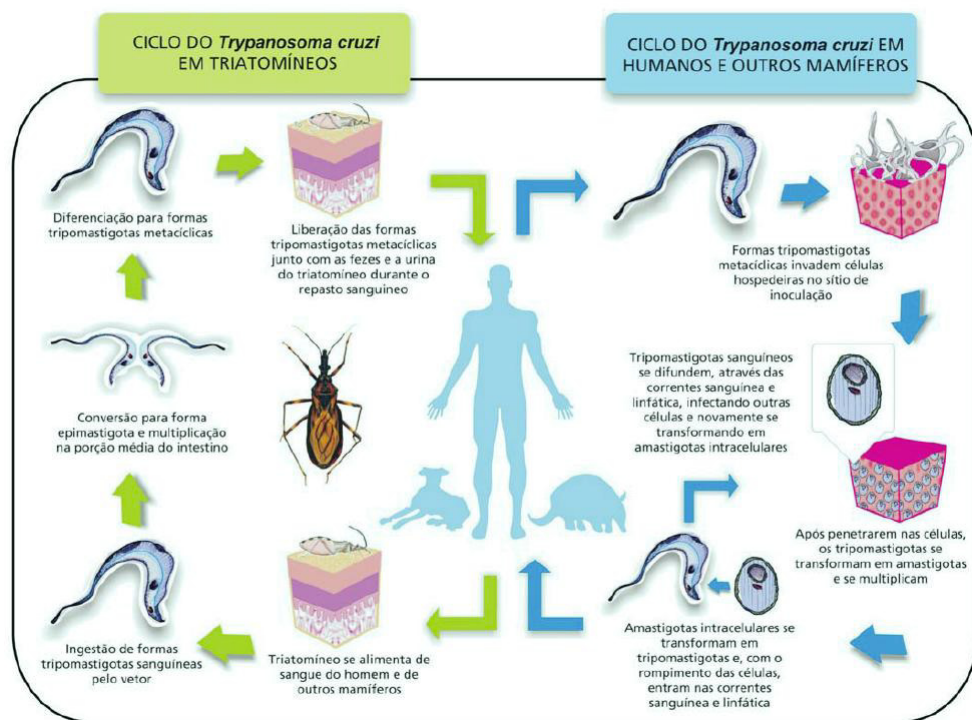


Figura 1.2 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*^[14,15].

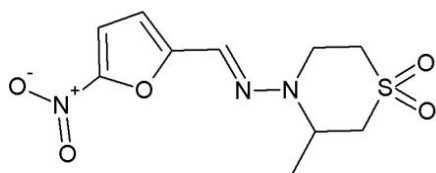
A doença de Chagas apresenta uma fase *aguda* e outra *crônica*. A primeira geralmente é assintomática embora raramente ela possa levar ao desenvolvimento da meningoencefalite que é fatal. Outros sintomas possíveis são: febre, linfadenopatia, anorexia, hepatoesplenomegalia e miocardites brandas. O caso crônico permanece assintomático entre dez e vinte anos. No entanto, neste período de bem-estar geral, o parasito está a reproduzir-se 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), cardiomiopatia (em 30% dos casos), dilatação do trato digestivo [megaesôfago ou megacólon (6%)], devido à destruição da inervação e das células musculares destes órgãos, responsável pelo seu tônus muscular. No cérebro há frequentemente formação de granulomas. Neste estágio a doença é geralmente fatal, mesmo com tratamento, devido à cardiomiopatia (insuficiência cardíaca)^[12, 14].

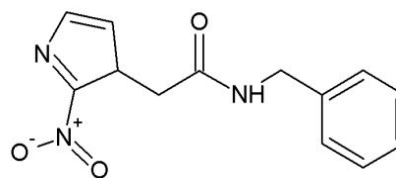
1.1.3 – Tratamento

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 porque elas afetam principalmente pessoas pobres nos países tropicais e, desse modo, elas não são vistas como um mercado atraente para impulsionar investimentos no desenvolvimento de novos fármacos^[16]. Por tudo isso, doenças como a malária, leishmaniose, doença do sono, filariase 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^[17].

Infelizmente, o descaso com a doença de Chagas é mais grave, ao ponto de alguns autores a considerarem como uma doença tropical *super-negligenciada*^[16,18]. Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença (Figura 1.3) são os mesmos que foram introduzidos há mais de 30 anos: Nifurtimox (Lampit®) e Benzonidazol (Rochagan®). Estes fármacos são ativos apenas na fase aguda da doença e, além disso, ambos causam sérios efeitos colaterais tais como anorexia, perda de peso, vômito, náusea, diarreia^[11,12]. Desde a última década, a empresa Bayer AG tem diminuído a fabricação do Nifurtimox, que é agora produzido somente em El Salvador e já não é mais comercializado no Brasil^[11].



Nifurtimox (Lampit®, Bayer)



Benzonidazol (Rochagan®, Roche)

Figura 1.3- Representação das estruturas químicas dos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.

A dose recomendada na fase aguda é 8-10 mg/kg/dia para o Nifurtimox e 5 mg/kg/dia para o Benzonidazol^[19]. A duração média do tratamento é de 60 dias, mas quando a doença crônica se manifesta, como nos pacientes imunodeficientes, o tratamento pode durar até 5 meses ou mais.

Os fármacos Nifurtimox e Benzonidazol são tripanocidas para todas as formas infectivas do *T. cruzi*. O mecanismo de ação proposto para esses dois fármacos é através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos^[20,21]. O grupo nitro de ambos os fármacos é reduzido para um grupo amino pela ação de nitroredutases, com a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos.

Uma das aproximações racionais para o controle quimioterapêutico das infecções parasitárias é 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^[11]. As enzimas envolvidas na biossíntese da tripanotiona, glutatiónil espermidina sintetase^[22] e tripanotiona sintetase não apresentam equivalentes no organismo dos mamíferos. As enzimas tripanotiona redutase (TR)^[23], preniltransferases^[24] e hipoxantina-guanina fosforibosil transferase²⁵ também têm sido identificadas como potenciais alvos quimioterapêuticos^[11,12,17,24-26].

Alguns pesquisadores que trabalham com doenças tropicais negligenciadas têm usado uma estratégia conhecida como “piggyback medicinal chemistry”^[29]. Essa estratégia tem como objetivo identificar novos agentes antiparasitários a partir de candidatos a fármacos que estão sendo avaliados para o tratamento de doenças “perseguidas” pela indústria farmacêutica. Já é possível observar progressos advindos do uso dessa estratégia e particularmente no caso da doença de Chagas três exemplos merecem destaque (Figura 1.4). O primeiro é o uso de fármacos usados no tratamento

de infecções causadas por fungos através da inibição da enzima lanosterol 14 α -demetilase (14DM), uma enzima da rota biossintética do ergosterol. Estudos com o Cetoconazol indicaram que esse composto apresenta uma constante de dissociação (K_D) frente à enzima 14DM igual a 0,2 μM ^[30]. Além disso, o valor de IC_{50} para a inibição da forma amastigota do parasito é de 0,3 nM^[29]. O segundo exemplo vem da observação de que o *T. cruzi* é sensível à ação dos bisfosfonatos (inibidores da enzima farnesilpirofosfato sintase – FPPS), atualmente usados na terapia de reabsorção óssea. Um análogo do fármaco Alendronato inibe a enzima FPPS e a forma amastigota do *T. cruzi* com valores de IC_{50} igual a 1,94 e 18 μM , respectivamente (Figura 1.4)^[31]. O último exemplo é o uso de análogos do Tipifarnib, inibidor da proteína farnesiltransferase (PFT) humana, que está sendo avaliado na fase clínica III para o tratamento do câncer. Diferente dos exemplos anteriores, o composto Tipifarnib não inibe a mesma enzima no homem e no parasito, já que no *T. cruzi* ele atua sobre a enzima 14DM. Gelb e colaboradores desenvolveram um análogo do Tipifarnib com reduzida afinidade pela enzima de humanos ($\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$) para reduzir a sua toxidez (Figura 1.4)^[29]. Esse composto apresentou uma elevada potência ($\text{IC}_{50} = 0,6 \text{ nM}$) contra a forma amastigota do *T. cruzi* e também mostrou resultados satisfatórios em um modelo *in vivo* da fase aguda da doença.

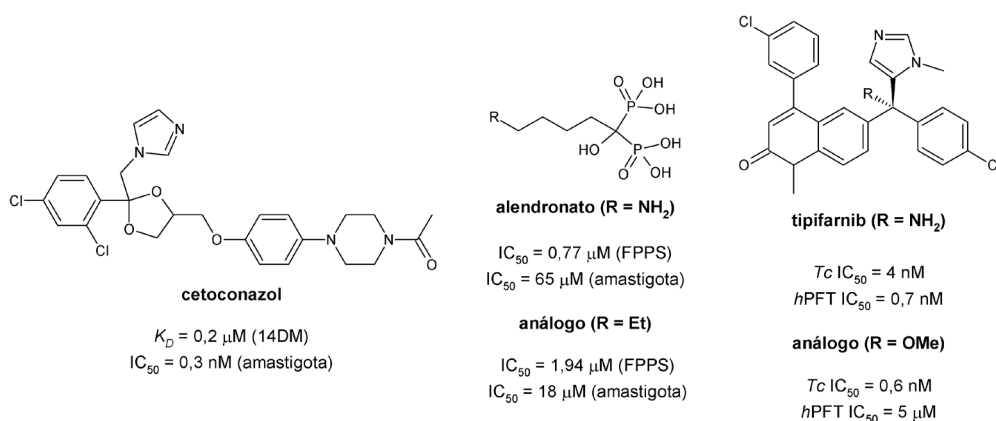


Figura 1.4 - Exemplos de compostos ativos contra diferentes alvos do *T. cruzi* identificados usando a estratégia “piggyback medicinal chemistry”.

1.2 – Glicólise

Dentre os vários processos metabólicos importantes para o parasito, a glicólise é 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 *glicosomo*^[32]. No glicosomo 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^[32].

Bakker *et al.* identificaram os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas usando modelos matemáticos para calcular quais as etapas da glicólise precisam ser menos inibidas para induzir a inibição de certa quantidade do fluxo glicolítico^[33]. A Tabela 1.2 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 1.2 - 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-fosfofrutocinase; 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^[33].

Extensos estudos do metabolismo do *T. brucei* mostraram que a forma tripomastigota usa a glicólise como sua única fonte para a obtenção de energia^[34,35]. 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^[36].

A forte dependência dos tripanossomatídeos pela via glicolítica para a obtenção de energia, 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 tripanossomicidas. 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^[35-41].

1.3 – Referências

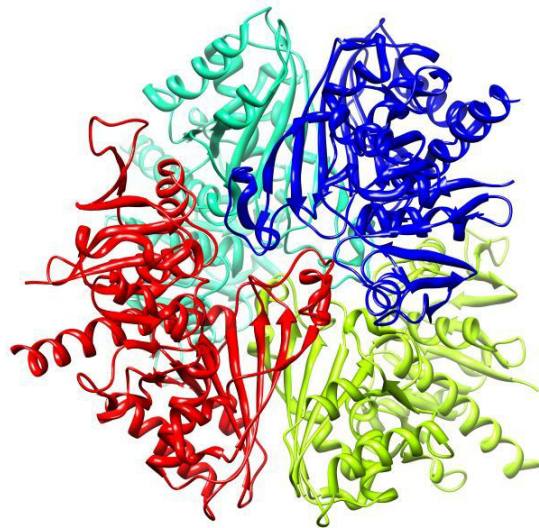
- [1] MASLOV, D.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.
- [2] CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **J. Med. Chem.**, Publication Date (Web): July 16, 2009.
- [3] MACHEY, Z. B.; BACA, A. M.; MALLARI, J. P.; APSEL, B.; SHELAT, A.; HANSELL, E. J.; CHIANG, P. K.; WOLFF, B.; GUY, K. R.; WILLIAMS, J. MCKERROW, J. H. Discovery of trypanocidal compounds by whole cell HTS of *Trypanosoma brucei*. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 67, n. 5, p. 355-363, 2006.
- [4] MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
- [5] HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- [6] GONTIJO, C. M. F., MELO, M. N. **Rev. Bras. Epid.** v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.
- [7] BARRET, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISNHA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- [8] BIBLIOTECA virtual Carlos Chagas. Disponível em: <<http://www4.prossiga.br/Chagas/index.html>>. Acesso em: 15 out. 2009.
- [9] FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I. M.; 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. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 6, p. 2476-2482, 2009.
- [10] FREITAS, R. F.; OPREA, T. I.; MONTANARI, C. A. 2D QSAR and similarity studies on cruzain inhibitors aimed at improving selectivity over cathepsin L. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 2, p. 838-853, 2008.
- [11] PAULINO, M.; IRIBARNE F.; DUBIN, M.; MORALES, S. A.; TAPIA, O.; STOPPANI, A. O. M. The chemotherapy of chagas' disease: an overview. **Mini-rev. in Med. Chem.**, v. 5, n. 5, p. 499-519, 2005.
- [12] LINÁRES, G. E.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. **Curr. Med. Chem.**, v. 13, n. 3, p. 335-360, 2006.
- [13] CARDOSO, A. V. N., LESCANO, S. A. Z., NETO, V. A., GAKIYA, E., SANTOS, S. V. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v. 48, n. 5, p. 287-289, 2006.

- [14] CHAGAS disease. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Chagas_disease>. Acesso em: 15 out. 2009.
- [15] DOENÇA de Chagas: 100 anos de sua descoberta. Disponível em: <<http://miriamsalles.info/wp/?p=3512>>. Acesso em: 20 out. 2009.
- [16] 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. 137-146, 2009.
- [17] PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M. A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n. 9, p. 727-740, 2005.
- [18] MOREL, C. M.; CARVALHEIRO, J. R.; ROMERO, C. N. P.; COSTA, E. A.; BUSS, P. M. The road to recovery. **Nature Biotech.**, v. 449, n. 7159, p. 180-182, 2007.
- [19] MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; VASQUEZ, P. I.; FERREIRA, J.; FAUNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp. Biochem. Physio. A**, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.
- [20] MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEÓN, W.; STOPPANI, A. O. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 218, n. 2, p. 585-591, 1982.
- [21] DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 2, p. 223-238, 1984.
- [22] VERBRUGGEN, C.; DE CRAECKER, S.; RAJAN, P.; JIAO, X. Y.; BORLOO, M.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H.; HAEMERS, A. Phosphonic acid and phosphinic acid tripeptides as inhibitors of Glutathionylspermidine synthetase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 6, n. 3, p. 253-258, 1996.
- [23] CUNNINGHAM, M. L.; ZVELEBIL, M. J.; FAIRLAMB, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. **Eur. J. Biochem.**, v. 221, n. 1, p. 285-295, 1994.
- [24] URBINA, J. A.; MORENO, B.; VIERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B. N.; YAN, W.; SCOTT, D. A.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 47, p. 33609-33615, 1999.
- [25] NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 11, p. 2455-2458, 1996.

- [26] CROFT, S. L.; BARRET, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **TRENDS in Parasit.**, v. 21, n. 11, p. 508-510, 2005.
- [27] URBINA, J., Chemotherapy of chagas disease. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, n. 4, p. 287-295, 2002.
- [28] URBINA, J.; DO CAMPO, R. Specific chemotherapy of chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasit.**, v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
- [29] KRAUS, J. M.; VERLINDE, C. L. M. J.; KARIMI, M.; LEPESHEVA, G. I.; GELB, M. H.; BUCKNER, F. S. Rational modification of a candidate cancer drug for use against chagas disease. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 6, p. 1639-1647, 2009.
- [30] LEPESHEVA, G. I.; OTT, R. D.; HARGROVE, T. Y.; KLESHCHENKO, Y. Y.; SCHUSTER, I.; NES, W. D.; HILL, G. C.; VILLATA, F.; WATERMAN, M. R. Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. **Chem. Biol.**, v. 14, n. 11, p. 1283-1293, 2007.
- [31] SZAJNMAN, S. H.; MONTALVETTI, A.; WANG, Y.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorg. Med. Chem. Let.**, v. 13, n. 6, p. 3231-3235, 2003.
- [32] VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILSON, M.; PÉRIE, J. J.; GILMORE, L. A. F.; 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 Res. Update**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.
- [33] BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOLFF, H. V. What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.
- [34] OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 127-151, 1987.
- [35] OPPERDOES, F. R. Biochemical peculiarities of trypanosomes, African and South American. **Br. Med. Bull.**, v. 41, n. 2, p. 130-136, 1985.
- [36] 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. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1987.
- [37] WILLSON, M., SANEJOUAND, Y. H., PERIE, J., HANNAERT, V., OPPERDOES, F. R. Sequencing, modeling, and selective inhibition of *Trypanosoma brucei* hexokinase. **Chem. Biol.**, v. 9, n. 7, p. 839-847, 2002.

- [38] CORDEIRO, A. T.; HARDRÉ, R.; MICHELS, P. A. M.; SALMON, L.; DELBONI, L. F.; THIEMANN, O. H. *Leishmania mexicana* glucose-6-phosphate isomerase: crystallization, molecular-replacement solution and inhibition. **Acta Cryst. B.**, v. D60, n. 5, p. 915-919, 2004.
- [39] NYASSE, B.; NONO, J.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. Trypanocidal activity of bergenin, the major constituent of *Flueggea virosa*, on *Trypanosoma brucei*. **Pharmazie**, v. 59, n. 6, p. 492-494, 2004.
- [40] 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. **Biochem.**, v. 41, n. 32, p. 10183-10193, 2002.
- [41] 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*. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 5, p. 1499-14502, 2006.
- [42] 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. **Biochem.**, v. 45, n. 8, p. 2556-2560, 2006.
- [43] 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. **J. Med. Chem.**, v. 43, n. 22, p. 4135-4150, 2000.

CAPÍTULO 2



Alvo enzimático

Neste capítulo são abordados aspectos importantes da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que é o alvo usado nesta tese como modelo para a seleção e identificação de novos candidatos a agentes anti-*T. cruzi*. Nesse contexto, serão apresentadas informações a respeito da reação e do mecanismo dessa enzima, bem como da sua estrutura. Além disso, os inibidores conhecidos dessa enzima também são apresentados.

2 – GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH)

2.1 – Reação e mecanismo

Nesse trabalho o alvo escolhido para a busca de novos fármacos contra a doença de Chagas foi a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), já que ela é uma das enzimas mais promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas. Nessa enzima ocorre a sexta reação da glicólise: a fosforilação oxidativa do *D*-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para *1,3*-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) (Figura 2.1)^[1].

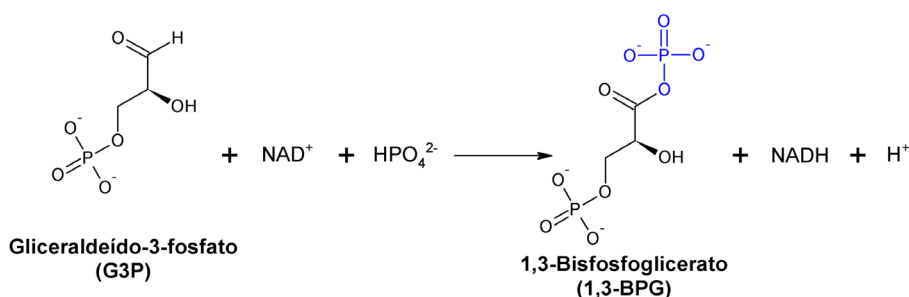


Figura 2.1 – Representação simplificada da fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG).

O mecanismo da reação ocorre no sítio ativo da GAPDH e envolve o ataque nucleofílico da cisteína catalítica (Cys166), através do seu grupo sulfidril (-SH), ao carbono carbonílico do G3P formando um intermediário tetraédrico hemitioacetal (Figura 2.2). Além da Cys166, outro resíduo que participa diretamente da catálise é a His194 que atua como uma base. Esse resíduo é responsável por ativar a Cys166 e também por facilitar a formação do intermediário tetraédrico^[2]. O intermediário se decompõe pela transferência de hidreto (:H⁻) para o cofator NAD⁺ formando um tio-éster altamente energético. A fosforilação desse último ocorre pelo ataque nucleofílico de um fosfato inorgânico que libera o produto (1,3-BPG) da enzima^[1].

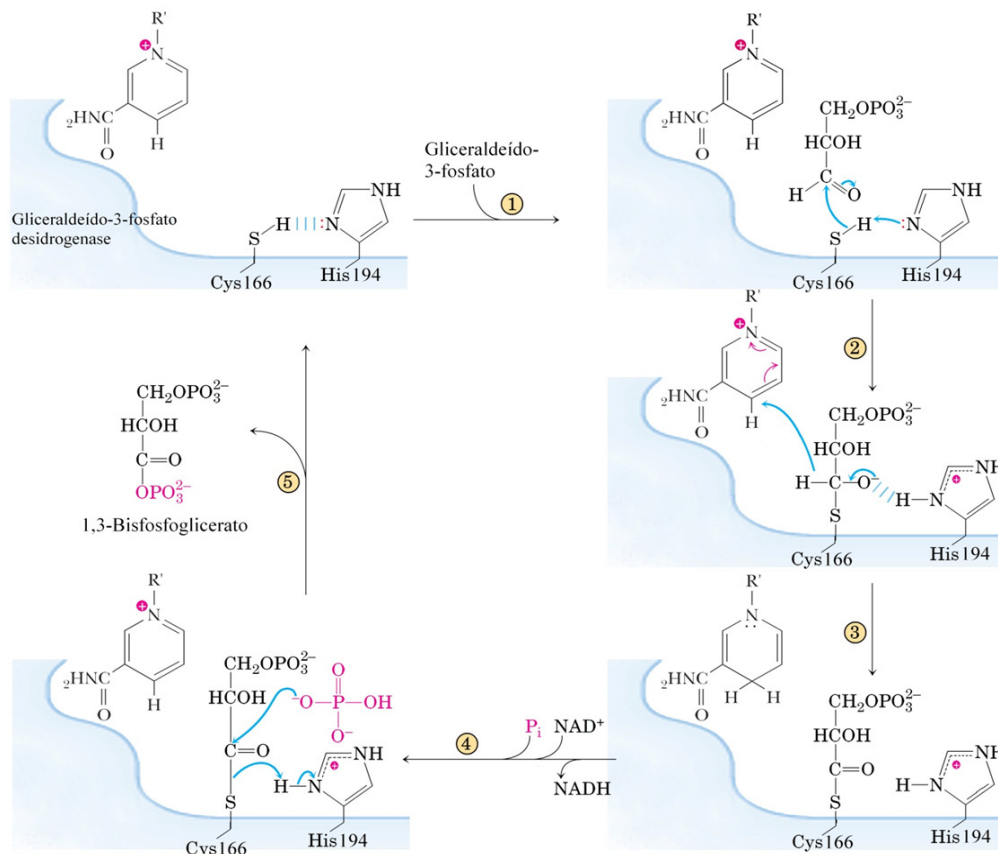


Figura 2.2.- Mecanismo da reação da enzima GAPDH: Após a formação do complexo enzima-substrato (1) ocorre a formação de uma ligação covalente hemitioacetil entre o substrato e o grupo -SH do resíduo de cisteína, facilitada pela catálise ácido-base com uma base vizinha, a histidina (His194). (2) Esse intermediário enzima-substrato é oxidado pelo NAD^+ ligado no sítio ativo, formando um intermediário covalente acil-enzima, um tioéster. (3) 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. (4) Essa ligação sofre uma fosforilação (ataque pelo P_i), liberando o produto 1,3-BPG.

2.2 – Estrutura

A enzima GAPDH tem sido extensivamente estudada e a estrutura cristalina dessa enzima está disponível para diferentes formas de parasitos e também para a forma humana^[3-12]. Ela é um homotetrâmero com uma massa molecular de aproximadamente 156 kDa (Figura 2.3a). Cada subunidade do tetrâmero é composta por dois domínios: o *domínio de ligação do NAD^+* e o *domínio catalítico* (Figura 2.3b). O domínio do NAD^+ compreende os resíduos 1-150 na extremidade N-terminal e os resíduos 331-359 na extremidade C-terminal. Este domínio contém uma alça formada pelos resíduos 66-76, encontrada somente na família *Trypanosomatidae*. Já o domínio catalítico compreende

os resíduos 151-330, incluindo os essenciais para a atividade catalítica, Cys166 e His194^[13].

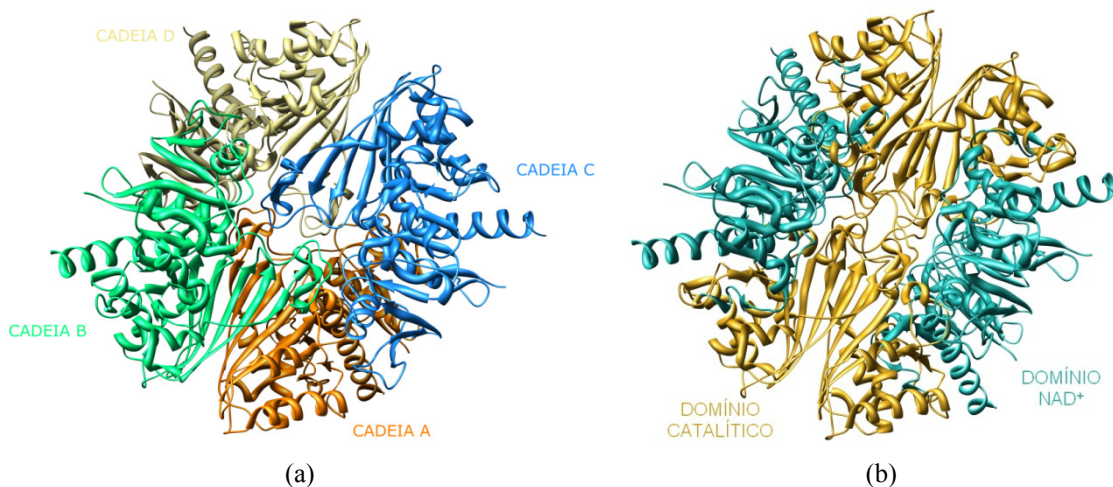


Figura 2.3 - (a) Representação em fita das quatro cadeias da enzima GAPDH; (b) representação em fita dos domínios NAD⁺ e catalítico. A figura foi gerada com o programa Chimera^[14].

Vários trabalhos apontam que o sítio ativo da GAPDH é formado por dois subsítios de ligação catiônicos e que estão relacionados à ligação do grupo fosfato do substrato (P_s) e do fosfato inorgânico (P_i)^[7,13,15]. O sítio P_s é constituído pelos resíduos Thr197, Thr199, Arg249 e a hidroxila da ribose do NAD⁺ (Figura 2.4a). Já o sítio P_i compreende os resíduos Thr167, Thr226, Ser247 e a Arg249 (Figura 2.4a). Inicialmente, acreditava-se que o G3P se ligasse apenas no sítio P_s como pode ser visto na figura 2.4b, na qual o G3P se liga nesse sítio na GAPDH de *Bacillus stearothermophilus*. Contudo, Kim *et al.* mostrou a existência de um segundo sítio para o fosfato inorgânico chamado *novo sítio* P_i ^[2]. Esse novo sítio foi identificado a partir do crescimento cristais num tampão fosfato e está situado a cerca de 2,9 Å do sítio P_i original. Estudos de modelagem molecular apontam que este novo sítio é apropriado para o ataque nucleofílico do fosfato inorgânico no intermediário tio-éster^[2]. Estudos mostram que o substrato G3P também é capaz de interagir com esse novo sítio^[16] (Figura 2.4c).

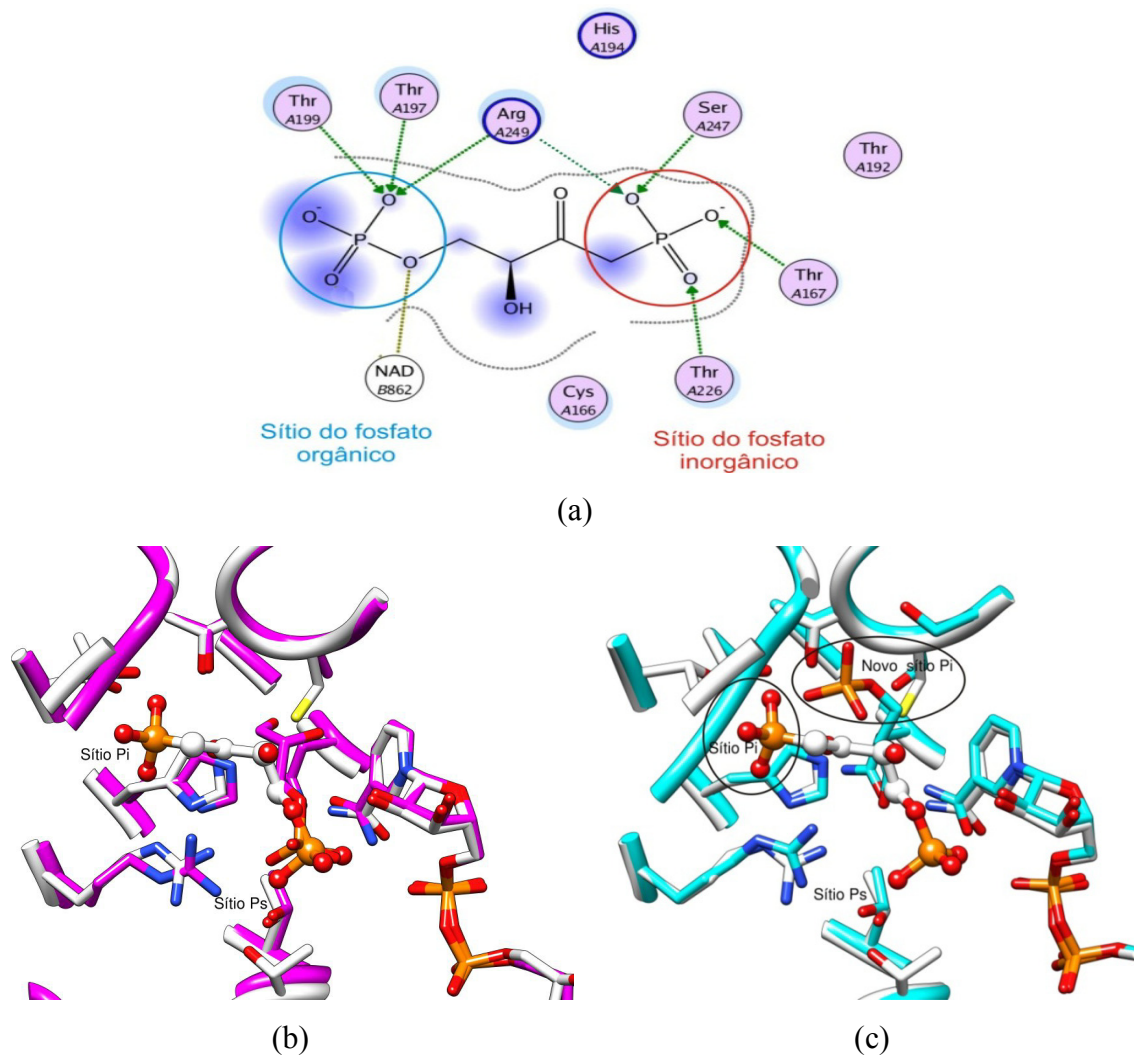


Figura 2.4 - (a) Representação bidimensional das interações entre o análogo do produto que se encontra cristalizado com a GAPDH de *T. cruzi* e os resíduos dos sítios P_s e P_i; Sobreposição da GAPDH de *T. cruzi* (cinza claro) com: (b) GAPDH de *B. stearotherophilus* (rosa) e (c) *C. parvum* (azul). O análogo do produto na enzima do *T. cruzi* está representado como bolas e varetas. Somente os heteroátomos estão coloridos por elemento. A figura (a) foi gerada com o programa MOE^[17], enquanto que a figura (b) e (c) foram feitas usando o programa Chimera^[14].

Skarzyński *et al.* propôs 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 carbono 3 (C3) do fosfato do G3P se liga primeiro no sítio P_i durante a etapa de acilação 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 assim como com estudos estruturais com a GAPDH de *Escherichia coli* e é conhecido como *mecanismo flip-flop*. A estrutura da GAPDH de *T. cruzi*, ligada covalentemente com um análogo do substrato também fornece suporte para esse mecanismo. Com a incorporação do novo sítio P_i, propõe-se que o carbono C3 do

fosfato do G3P se ligue inicialmente nesse sítio e então muda para o sítio P_s antes da transferência de hidreto^[16].

Em outro trabalho recente, Cook *et al.* conseguiram obter uma estrutura da GAPDH de *Cryptosporidium parvum* complexada com o G3P e com o NAD⁺ graças a uma mutação em que a cisteína catalítica (Cys153, na numeração deles) foi substituída por uma serina (Ser)^[19]. Eles verificaram que o C3 do fosfato do G3P tem uma preferência por se ligar no novo sítio P_i (Figura 2.4c). Desse trabalho eles concluíram que o sítio da GAPDH apresenta uma formidável plasticidade, no qual ele é 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 volta do sítio P_s. Esse resíduo também é importante para regular a ligação do substrato no sítio ativo e a 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. Durante a catálise essa interação seria rompida para que a Arg249 auxilie no correto posicionamento do substrato e na remoção do produto do sítio ativo. Esse mecanismo tem sido chamado de *mecanismo de gatilho*^[13].

2.3 – Inibidores

2.3.1 – Inibidores irreversíveis

Para entender melhor o papel das interações entre as subunidades no mecanismo catalítico da GAPDH, Li *et al.* avaliaram dois reagentes alquilantes, cloro e bromoacetifosfonato, como inibidores irreversíveis da cisteína catalítica em enzimas de diferentes organismos (porco, coelho, galinha, humana)^[20] (Figura 2.5). Estes inibidores foram planejados para imitarem estruturalmente o ataque do fosfato inorgânico na enzima. Foi observado que a GAPDH exibe uma propriedade interessante: a reatividade em metade dos sítios. Assim, quando duas subunidades (ou cadeias) são modificadas pelo agente alquilante, a GAPDH perde toda a sua atividade catalítica. Além disso, verificou-se também que o NAD⁺ facilitaria a alquilação através de interações eletrostáticas ou via a indução de mudanças conformacionais.

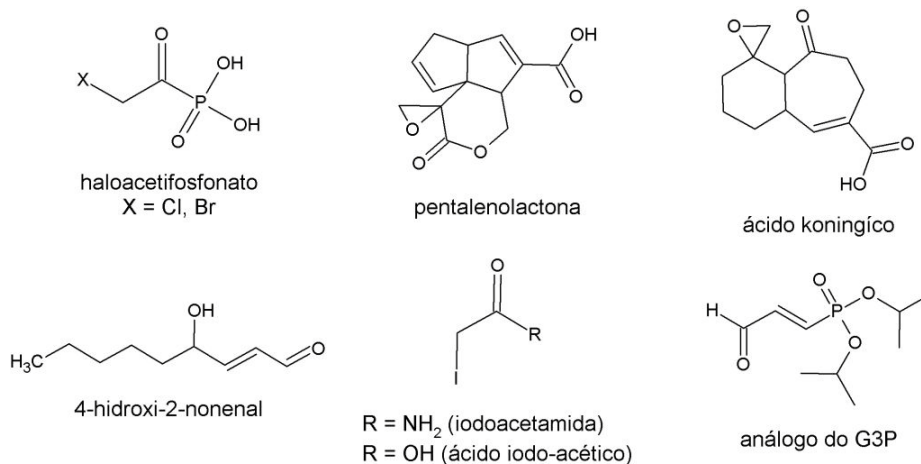


Figura 2.5 - Estruturas representativas das classes de inibidores irreversíveis da GAPDH de *T. cruzi*.

Cane *et al.* observaram que a incubação do antibiótico sesquiterpeno de origem natural (produzido por fungos) pentalenolactona com a GAPDH de coelho resulta em uma inibição tempo-dependente e irreversível pela modificação da Cys 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 ($k_{inat} = 3,3 \text{ min}^{-1}$; $K_i = 11,8 \text{ } \mu\text{M}$) e outra fase lenta, mas com uma afinidade superior ($k_{inat} = 1,3 \text{ min}^{-1}$; $K_i = 6,12 \text{ } \mu\text{M}$)^[21,22].

Além da pentalenolactona, outro antibiótico obtido de fungos, o ácido koningíco, é um potente inibidor irreversível 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 visando 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 um LD₁₀₀ (concentração de inibidor necessária para inibir o crescimento do parasito em 100%) igual a 0,6 μM contra a forma tripomastigota do *T. brucei*. Essa concentração está bem abaixo de fármacos usados 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), o maior produto da peroxidação de lipídeos, é um potente inibidor 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 (Cys149) 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. Com essa técnica eles verificaram a presença de cinco peptídeos, os quais contêm o composto HNE ligado na His164, Cys244, Cys281, His327 e Lys331. Surpreendentemente a modificação do sítio ativo (Cys149) não foi observada, sugerindo que a inativação da enzima GAPDH pelo HNE ocorre devido a modificação seletiva dos aminoácidos localizados na superfície da enzima.

Atualmente, estão reportadas na literatura apenas três classes de inibidores irreversíveis da GAPDH de *T. cruzi*: haloacetamida (iodoacetamida), haloácido (ácido iodo-acético) e *p*-nitrofenol éster-fosfonato. Nas duas primeiras classes, os compostos apresentam um átomo de iodo, que é um bom grupo abandonador, ligado no carbono alfa da carbonila. A estrutura cristalográfica desses inibidores complexados com a GAPDH foi obtida por Guido *et al.*^[25,26]. A estrutura do inibidor ácido iodo-acético se liga covalentemente com a enzima através da cisteína catalítica (Cys166)^[26]. Além disso, ele forma uma ligação de hidrogênio mediada pela água com o NAD⁺. Em outro trabalho, Castilho *et al.* sintetizaram uma série de compostos da classe *p*-nitrofenol éster-fosfonato que mimetizam o substrato G3P. Esses inibidores inibiram a GAPDH de *T. cruzi* de maneira tempo-dependente^[8]. A enzima foi inibida seguindo uma cinética de pseudo-primeira ordem e o composto mais potente exibiu um k_{inat} igual a $7000 \text{ M}^{-1} \text{ m}^{-1}$. A estrutura cristalográfica do complexo foi obtida e verificou-se que o composto se liga covalentemente com a Cys166 em duas conformações diferentes, uma com o grupo fosfonato posicionado no sítio P₁ 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.

2.3.2 – Inibidores reversíveis

Uma análise da literatura mostrou que 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 fonte 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*^[26-28]. Recentemente publicamos um trabalho em que três flavonóides glicosilados se mostraram inibidores da enzima GAPDH de *T. cruzi*. O composto mais potente dessa série foi o tilirosídeo com um IC₅₀ (concentração necessária para que o composto iniba a atividade enzimática em 50%) igual a 46 μM^[30] (Figura 2.6). No mesmo trabalho, três ácidos anacárdicos inibiram a enzima com IC₅₀ que variaram entre 38-161 μM. A potência desses compostos aumenta à medida que o número de ligações duplas na cadeia alquílica de carbono aumenta, sendo que o composto mais potente possui três ligações duplas.

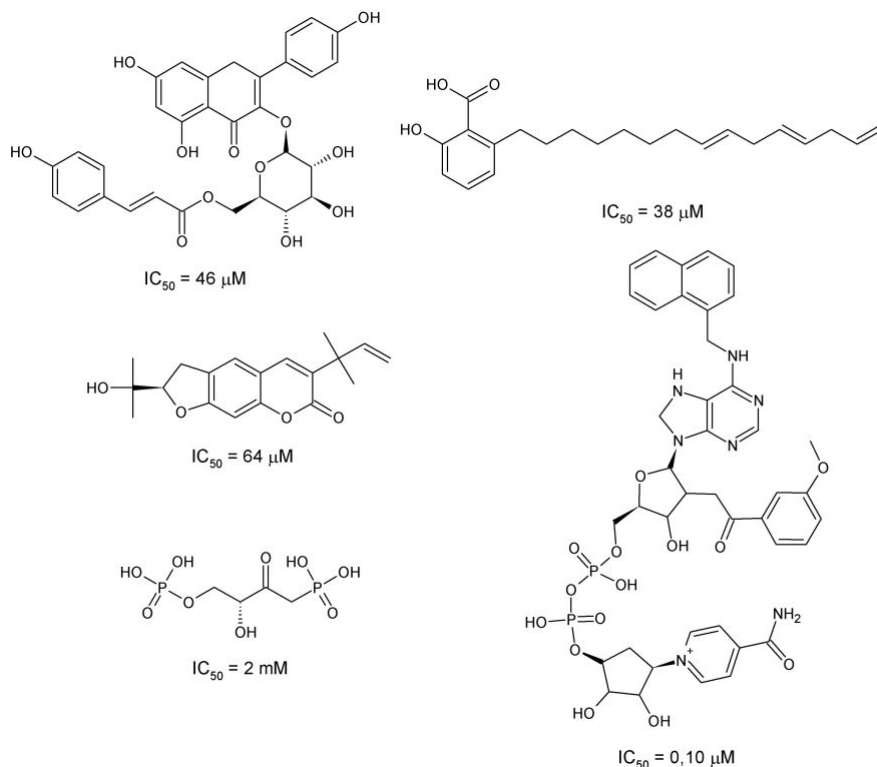


Figura 2.6 - Estruturas representativas das classes de inibidores reversíveis da GAPDH de *T. cruzi*.

As cumarinas também são 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* e 20% desses mostraram uma significativa atividade contra a GAPDH do parasito (> 80%). Esses extratos foram então purificados e a estrutura de 13 cumarinas foram determinadas^[31]. O composto mais potente foi a chalepina com um IC₅₀ igual a 64 μM (Figura 2.6), enquanto que as outras cumarinas apresentaram valores de IC₅₀ entre 93-617 μM. A estrutura cristalina do co-complexo entre a chalepina e a GAPDH revelaram que esse composto se liga no sítio ativo da enzima e é estabilizado através de

uma ligação de hidrogênio mediada pela água com o resíduo Thr167^[6]. O grupo prenila da chalepina também exibe interações hidrofóbicas com a Cys166.

Ladame *et al.* avaliaram uma série de compostos análogos do produto da reação (1,3BPG) contra a GAPDH de *T. cruzi* e *T. brucei*^[7]. Apesar da elevada similaridade desses compostos com o 1,3BPG, eles se mostraram como sendo inibidores modestos da GAPDH dos parasitos, exibindo valores IC₅₀ na faixa de alto micromolar (500-2000 µM). A estrutura cristalográfica de um desses compostos foi obtida e observou-se que este se liga no sítio ativo da enzima, posicionando um grupo fosfato no sítio P_s e o grupo fosfonato no sítio P_i da GAPDH. Apesar desse composto estar ligado no sítio ativo da enzima, o valor do seu IC₅₀ é de apenas 2 mM (Figura 2.6).

De todos os compostos avaliados até hoje contra a GAPDH de tripanossomatídeos, sem dúvida os análogos de nucleosídeos estão entre os mais potentes. O grupo do professor 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*^[3, 31-35]. O planejamento desses inibidores se beneficiou da disponibilidade da estrutura cristalina da GAPDH desses três parasitos. Comparando-se a estrutura da enzima dos parasitos com a enzima de humanos vários inibidores seletivos foram sintetizados explorando a diferença entre as duas enzimas. Desses inibidores, o mais potente contra a GAPDH de *T. cruzi* foi um composto análogo ao cofator NAD⁺ que apresenta um IC₅₀ igual a 0,10 µM^[37] (Figura 2.6). Além disso, esse inibidor foi inativo contra a enzima de humanos nas concentrações de 100 e 500 µM.

Apesar de um número relativo elevado de inibidores já terem sido encontrados contra a GAPDH de *T. cruzi*, nenhum deles se mostrou muito promissor até o presente momento. Isso pode estar ligado ao fato de que esses compostos não foram capazes de inibir as formas infectivas do parasito (tripomastigota e amastigota) na concentração recomendada (IC₅₀ < 10 µM) para se tornarem candidatos a fármacos. Outro aspecto é que provavelmente embora alguns sejam capazes de inibir as formas infectivas do *T. cruzi*, as propriedades farmacocinéticas e a seletividade desses compostos não são apropriadas. Com isso, é clara a necessidade da busca e o desenvolvimento de novos inibidores mais efetivos e seguros contra a GAPDH de *T. cruzi* que possam se tornar compostos-matrizes.

2.4 – Referências

- [1] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Glycolysis. In: **BIOCHEMISTRY**, London: Hardcover, 1999. p. 609-638.
- [2] 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.
- [3] ARONOV, A. M.; SURESH, S.; BUCKNER, F. S.; VAN VOORHIS, W. C.; VERLINDE, C. L.; OPPERDOES, F. R.; HOL, W. G.; GELB, M. H. Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, n. 8, p. 4273-4278, 1999.
- [4] SURESH, S.; BRESSI, J. C.; KENNEDY, K. J.; VERLINDE, C. L.; GELB, M. H.; HOL, W. G. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. **J. Mol. Biol.**, v. 309, n. 2, p. 423-435, 2001.
- [5] KIM, H.; HOL, W. G. Crystal structure of *Leishmania mexicana* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in a new crystal form confirms the putative physiological active site structure. **J. Mol. Biol.**, v. 278, n. 1, p. 5-11, 1998.
- [6] PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. 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 Lett.**, v. 520, n. 1, p. 13-17, 2002.
- [7] LADAME, S.; CASTILHO, M. S.; SILVA, C. H.; 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. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, n. 22, p. 4574-4586, 2003.
- [8] 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.
- [9] 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.; HOL, W. G. Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 6, p. 2355-2359, 1993.
- [10] JENKINS, J. L., TANNER, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallogr. Sect. D**, v. 62, n. 3, p. 290-301, 2006.

- [11] 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 Crystallogr. Sect. D**, v. 61, n. 9, p. 1213-1221, 2005.
- [12] 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.
- [13] SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESU, 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 Lett.**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.
- [14] 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. **J Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [15] DIDIERJEAN, C.; CORBIER, C.; FATIH, M.; FAVIER, F.; MULLER, S. B.; 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. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 15, p. 12968-12976, 2003.
- [16] 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.
- [17] CHEMICAL Computing Group, MOE 2009 [Programa de Computador]. Quebec: [s.n], 2009, 1 CD-ROM.
- [18] SKARŻYŃSKI, T.; MOODY P. C. E.; WONACOTT, A. J. Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 193, n. 1, p. 171-187, 1987.
- [19] COOK, W. J.; 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 Struct. Biol.**, v. 9, n. 9, p. 2-13, 2009.
- [20] LI, Y. K.; BOGGARAM, J.; BYERS, L. D., Alkylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with haloacetylphosphonates. **Biochem. J.**, 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. *Arch. Biochem. Biophys.*, 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. *Let. in Drug Des. Discov.*, 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*. *Chem. Pharm. Bull.*, 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). *J. Braz. Chem.*, 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. *Bioorg. Med. Chem.*, 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. *Pur. Appl. Chem.*, 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*. **Bioorg. Med. Chem.**, 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 trypanosomal glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **J. Med. Chem.**, v. 38, n. 19, p. 3838-3849, 1995.

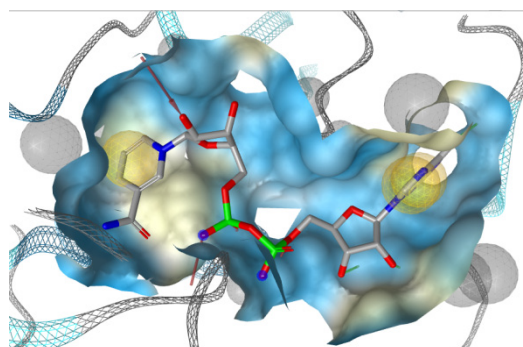
[34] ARONOV, A. M.; GELB, M. H. Synthesis and structure-activity relationships of adenosine analogs as inhibitors of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Modifications at positions 5' and 8. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 8, n. 24, p. 3505-3510, 1998.

[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. **J. Med. Chem.**, v. 41, n. 24, p. 4790-4799, 1998.

[36] 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. **J. Med. Chem.**, v. 44, n. 13, p. 2080-2093, 2001.

[37] KENNEDY, K. J.; BRESSI, J. C.; GELB, M. H. A disubstituted NAD⁺ analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 11, n. 2, p. 95-98, 2001.

CAPÍTULO 3



A Quiminformática e o planejamento de fármacos

Neste capítulo é abordado o papel essencial da química medicinal no planejamento de fármacos. Também são apresentados os métodos em quiminformática que são ferramentas usadas pela química medicinal para “navegar” pelo espaço químico-biológico.

3 – O PAPEL DA QUÍMICA MEDICINAL NA DESCOBERTA DE FÁRMACOS

3.1 – Definição e objetivos

Considerando o aspecto prospectivo, o objetivo da química medicinal é o desenvolvimento e a produção de compostos que possam ser usados na medicina para a prevenção, tratamento e cura de doenças. Pelo lado retrospectivo, a química medicinal também inclui o estudo dos fármacos existentes, de suas propriedades farmacológicas e suas relações entre a estrutura química e a atividade biológica^[1].

De acordo com a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada) a química medicinal “*é uma disciplina baseada na química, também envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica. Seu interesse esta na invenção, descoberta, desenvolvimento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo de seu metabolismo, a interpretação de seu modo de ação ao nível molecular e a construção de relações estrutura-atividade*”^[2].

3.2 – As fases da descoberta e desenvolvimento de um fármaco

O processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco é dividido em duas grandes fases: (i) fase pré-clínica (descoberta e otimização) e (ii) fase clínica (desenvolvimento)^[1]. Inicialmente na fase pré-clínica há identificação e validação do alvo terapêutico (receptor, enzima, grupo transportador, modelo celular ou *in vivo*). A correta identificação e seleção de um alvo validado é uma etapa chave para o sucesso posterior de um projeto em química medicinal^[3]. Em seguida vem a identificação (ou descoberta) e produção de novas substâncias ativas que apresentem interação com o alvo selecionado (Figura 3.1). A identificação dos compostos bioativos pode envolver triagens reais ou virtuais, usando os diferentes métodos em química medicinal. Tais compostos são usualmente conhecidos como *ligantes* (hits) e podem ser oriundos de produtos naturais, síntese química ou processos biotecnológicos. Os ligantes geralmente apresentam baixa afinidade pelo alvo e na otimização há o aperfeiçoamento da estrutura dos ligantes até se tornarem *compostos-matrizes* (leads). O processo de otimização tem a finalidade de promover um aumento na potência, seletividade e uma diminuição da

toxicidade (Figura 3.1). Essas características permitem o estabelecimento e análise das *relações estrutura-atividade (SAR)*, num contexto ideal para permitir o entendimento do modo de ação ao nível molecular. Contudo, a avaliação de parâmetros farmacocinéticos tais como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) e biodisponibilidade oral já é realizada nos primeiros estágios do projeto para eliminar moléculas indesejáveis.

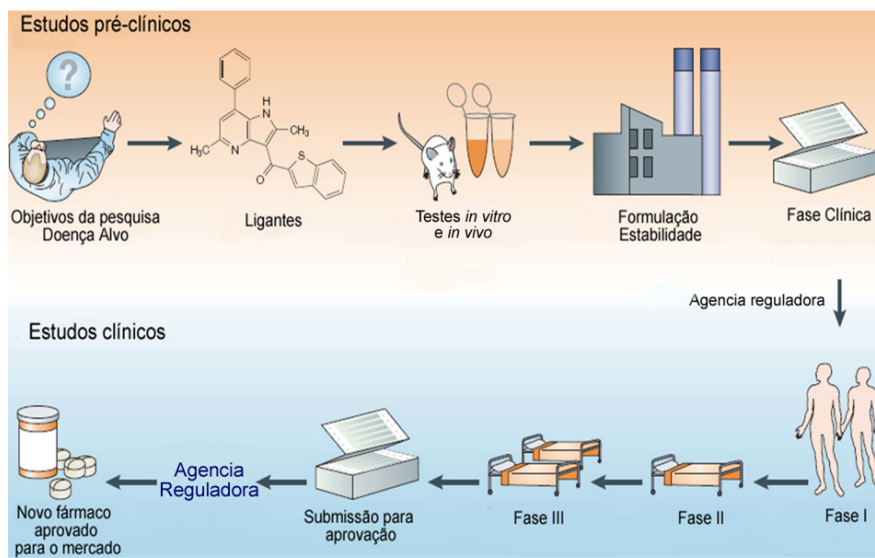


Figura 3.1 - Os estágios da descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco.

Na fase clínica, a proposta é o aperfeiçoamento das propriedades farmacocinéticas e o fino ajuste das propriedades farmacêuticas (formulação química) das substâncias selecionadas para que estas se tornem aptas ao uso clínico. Os compostos-matrizes são submetidos a vários ensaios toxicológicos em animais. Se passarem por todos os testes, toda a pesquisa acumulada é reunida e submetida às agências reguladoras (FDA nos Estados Unidos e ANVISA no Brasil) para obter o título de *investigação de novo fármaco* (IND, nos Estados Unidos). Em caso de aprovação, os testes clínicos se iniciam na fase I. Nessa fase os candidatos são avaliados em um pequeno número (dezenas) de voluntários humanos saudáveis (*prova de conceito*) com o objetivo específico de validar os modelos pré-clínicos no homem^[4]. Os estudos na fase II englobam a avaliação detalhada da segurança e eficácia dos compostos numa população de pacientes maior (centenas de pacientes)^[4]. A fase III envolve milhares de pacientes em múltiplos centros clínicos, geralmente em diversos países^[4]. O objetivo desses estudos é demonstrar a eficácia por um longo período e a segurança do fármaco. Após a finalização dos estudos em fase clínica, um pedido de *requisição de um novo*

fármaco (NDA, nos Estados Unidos) é submetido à agência reguladora que aprova ou não a comercialização do candidato a fármaco (Figura 3.1). No Brasil, o IND e o NDA correspondem à emissão de comunicado especial (CE) e registro de medicamentos, respectivamente, que são requeridos junto à ANVISA^[5].

3.3 – As três principais fases da atividade de um fármaco

A atividade de um fármaco depende da sequência de eventos que começa quando a molécula penetra no organismo vivo e que culmina quando esta encontra o seu alvo e elícita a propriedade biológica de interesse. Classicamente admite-se que existam três fases características que governam a atividade biológica de um fármaco num organismo vivo: as fases *farmacêutica*, *farmacocinética* e *farmacodinâmica*^[1]. A fase farmacêutica está relacionada com a escolha da forma de administração apropriada e com a formulação farmacêutica e tem o objetivo de otimizar a distribuição e facilitar a absorção. As possíveis rotas de administração são oral, intravenosa, nasal, transdermal, etc. Na formulação é feita a decisão se o composto irá ser administrado na forma de comprimidos, cápsulas, líquido, etc.

A fase farmacocinética controla os diferentes parâmetros que governam o caminho percorrido pelo fármaco desde a sua administração até o seu encontro como o alvo^[1]. Essa fase preocupa-se em avaliar e prever os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco. 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.). A corrente sanguínea se encarrega de distribuí-lo pelo organismo. A função do metabolismo é transformar o fármaco num composto mais solúvel em água para facilitar a sua eliminação pela urina. Uma vez que ele exerce seu efeito ele deve ser eliminado do organismo, senão a sua acumulação irá provocar efeitos colaterais. As principais rotas de eliminação são a renal (urina) e retal (fezes).

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^[1]. Partindo de um composto pouco potente e não seletivo, o desafio é maximizar a potência e a seletividade e minimizar os efeitos adversos. A resposta biológica é máxima quando a molécula 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 um tamanho, forma, propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas apropriadas. Quanto maior é o ajuste do composto com o sítio do alvo, mais seletivo será o fármaco em eliciar apenas o efeito desejado.

3.4 – A quiminformática e o planejamento de fármacos

3.4.1 – O espaço químico-biológico

O planejamento e desenvolvimento de um novo fármaco é um processo longo, complexo, caro e altamente arriscado^[6]. Uma análise de 68 fármacos aprovados estimou que são necessários em média 15 anos para que uma nova entidade química (NCE) chegue ao mercado ao custo de 800 milhões de dólares^[7], podendo chegar a US\$1,4 bilhão. Na fase de pesquisa, somente uma pequena fração dos compostos são selecionados como candidatos a fármacos para o desenvolvimento. Nessa fase, experiências têm mostrado que aproximadamente 1 de 15-25 candidatos a fármacos sobrevive aos rigorosos testes de segurança e eficácia (em animais e humanos). Claramente esta é uma atividade altamente arriscada, mas os potenciais benefícios para milhões de pacientes com graves doenças fornece uma constante motivação. Além disso, a introdução no mercado de um novo fármaco pode gerar bilhões de US\$ anuais. Como exemplos de *blockbusters* (termo do inglês para designar os fármacos com vendas anuais acima de US\$ 1 bilhão) temos a atorvastatina (Liptor®, Pfizer) e o Clopidogrel (Plavix) com vendas estimadas em 2007 de 12 e 5,9 bilhões de dólares, respectivamente^[8].

Mesmo após o aumento dos investimentos e a introdução de novas tecnologias (química combinatória, ensaios automatizados em larga escala – HTS) pela indústria farmacêutica, a taxa de sucesso – partindo-se da escolha do alvo até a obtenção do registro junto às agências reguladoras – é de apenas 10% e o número de novos fármacos aprovados anualmente permanece constante entre 20-30 compostos^[9]. Atualmente, 30% dos compostos que chegam aos estágios finais do desenvolvimento clínico são abandonados em decorrência: (i) da ausência de eficácia e (ii) segurança clínica e toxicológica insuficiente^[10].

Com certeza, um dos motivos das dificuldades encontradas no planejamento e desenvolvimento de um composto até este se tornar um fármaco é o tamanho do *espaço químico* no qual a busca é realizada. O espaço químico pode ser visto como sendo análogo ao Universo em sua vastidão, em que os compostos químicos ocupam o lugar das estrelas. Por exemplo, o número de substâncias teoricamente sintetizáveis usando apenas a combinação de poucos átomos (C, O, H, N, P, S, F, Cl, Br, I) e com uma massa molecular (MM) menor que 500 Da gira em torno de 10^{40} a 10^{120} substâncias. Atualmente, o número de compostos existentes, de acordo com o Chemical Abstracts, já passa de 50 milhões^[11]. Com isso, é assumido que o espaço químico, do ponto de vista prático, é infinito. Além disso, nem todo composto químico apresenta atividade biológica e, menos ainda, propriedades para se tornar um fármaco. Em virtude disso, o desafio da química medicinal é encontrar as prováveis regiões que contêm compostos biologicamente ativos, isto é, o espaço químico biologicamente relevante que é chamado de espaço *químico-biológico*^[12] (Figura 3.2). Em termos das propriedades físico-químicas e dos descritores topológicos, os compostos terapeuticamente úteis se agrupam em “galáxias”. A experiência adquirida ao longo dos anos em vários projetos de química medicinal e programas de HTS sugerem que os compostos que se ligam em certas classes de alvos se aglomeram próximas umas das outras em discretas regiões do espaço químico (Figura 3.2).

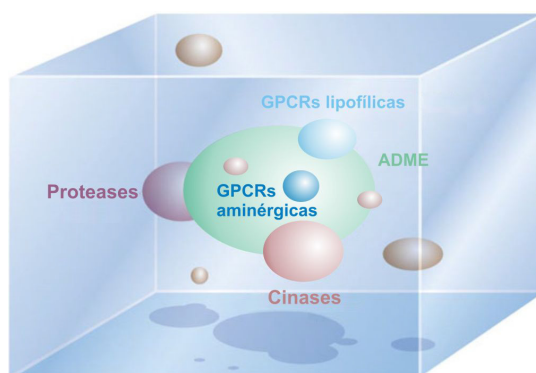


Figura 3.2 - Representação do espaço químico e do espaço químico-biológico. Os compostos terapeuticamente úteis se agrupam formando “galáxias”.

Com o aperfeiçoamento da informática foi possível unir a química e a informática gerando uma nova área a *quiminformática*^[13,14]. De acordo com Brown “*a quiminformática transforma dados em informação e informação em conhecimento cuja intenção é realizar as melhores e mais rápidas decisões na área de desenvolvimento de*

fármacos”^[15]. Uma definição mais ampla foi dada por Gastaiger: “a quiminformática é o uso dos métodos da informática para resolver problemas químicos”^[16].

A química medicinal navega pelo imenso espaço químico-biológico usando os métodos em quiminformática. Estes métodos são usados na aquisição, gerenciamento, análise, visualização e no uso das informações relacionadas aos compostos químicos e as suas propriedades. O uso desses métodos é baseado na premissa de que o conhecimento da estrutura e das propriedades dos ligantes bem sucedidos e daqueles que falham é valioso para o enriquecimento, identificação e otimização dos candidatos^[17]. A química medicinal emprega os métodos em quiminformática desde a identificação do ligante, passando pela seleção do composto-matriz até a fase pré-clínica (Figura 3.3).

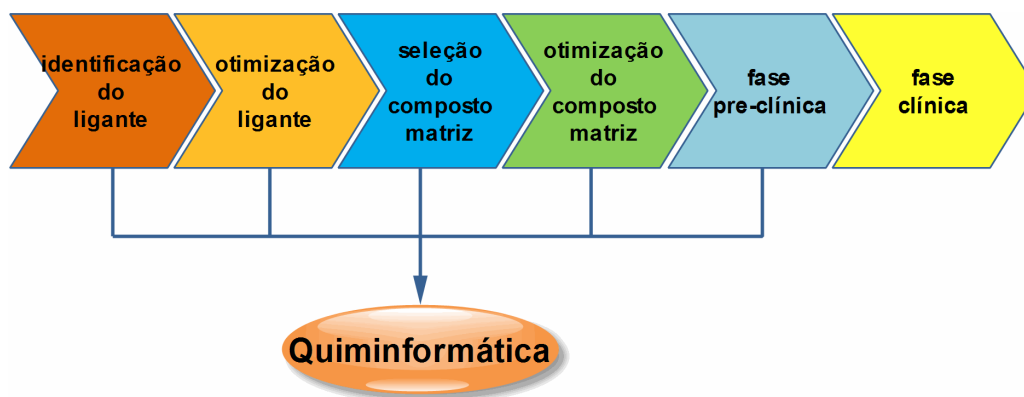


Figura 3.3 - Aplicação dos métodos em quiminformática nos diferentes estágios do processo de desenvolvimento de um fármaco.

3.4.2 – O ensaio virtual

A quiminformática possibilitou também a introdução de tecnologias avançadas na busca por novos fármacos evitando assim, a síntese de compostos triviais que dificilmente se tornariam novos medicamentos. Dentre essas técnicas destacam-se o *ensaio virtual* (virtual screening)^[18]. Ele tem sido usado como uma abordagem alternativa à técnica de HTS, na qual realiza-se o ensaio *in silico* de coleções de compostos (reais ou virtuais) buscando aqueles que apresentam uma complementaridade significativa com o sítio ativo do alvo. Somente os compostos que são preditos como tendo grandes chances de se ligarem no alvo serão selecionados e avaliados experimentalmente^[19].

Historicamente, existem duas formas de planejamento utilizadas no ensaio virtual: o *planejamento baseado na estrutura do ligante* (LBDD) e o *planejamento baseado na estrutura do receptor* (SBDD). O planejamento baseado na estrutura do ligante é usado para identificar moléculas com características (pontos farmacofóricos, descritores estruturais) similares à dos ligantes conhecidos e que provavelmente também irão apresentar afinidade pelo alvo^[19] (Figura 3.4). Nessa estratégia não há a necessidade do conhecimento da estrutura 3D do alvo. O ensaio virtual baseado na estrutura do alvo, por outro lado, requer o uso da estrutura do alvo, a qual pode ser obtida experimentalmente (Raios-X, RMN) ou computacionalmente (homologia) (Figura 3.4). Nessa estratégia, o objetivo é explorar o reconhecimento molecular entre o ligante e o alvo biomacromolecular (proteína, enzima, receptor, DNA, etc.) e priorizar a seleção dos compostos com elevada probabilidade de se ligarem na biomacromolécula^[20]. Na ausência de uma coleção de compostos, pode-se usar a estratégia de planejamento baseado na estrutura do alvo conhecida como *de novo*. Nessa estratégia, é feita a “criação” de compostos que se ajustem otimamente ao sítio do alvo. O maior problema dessa estratégia é a síntese dos compostos propostos^[21].

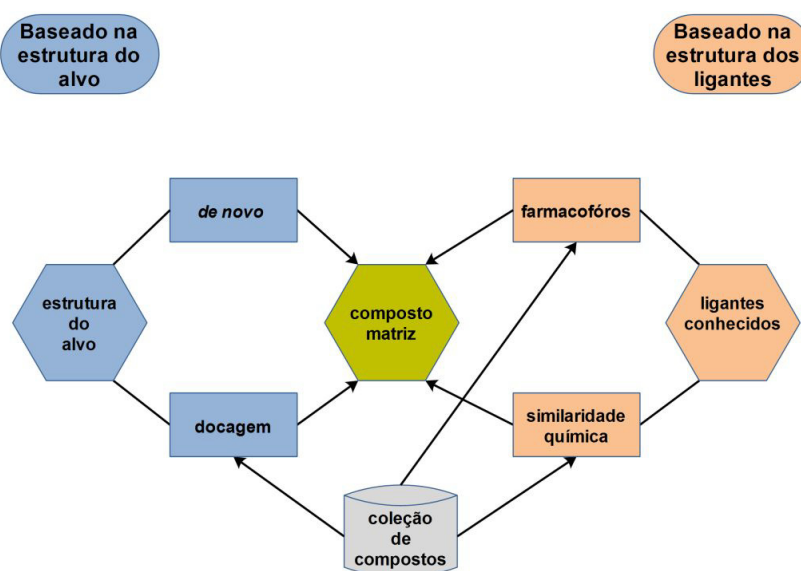


Figura 3.4 - Possíveis estratégias usadas no ensaio virtual.

3.5 – Referências

- [1] WERMUTH, C. G. Medicinal chemistry: definition and objectives, the three main phases of drug activity, drug and disease classifications. In: *The PRACTICE OF MEDICINAL CHEMISTRY*. Amsterdam: Academic Press, 2003. p. 29-31.
- [2] WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERB, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure Appl. Chem.**, v. 70, n. 1, p. 1129-1143, 1998.
- [3] OPREA, T. I.; TROPSHA, A. Target, chemical and bioactivity databases – integration is key. **Drug Discov. Today**, v. 3, n. 4, p. 357-365, 2006.
- [4] PUDIPEDI, M.; SERAJUDDIN, A. T. M.; MUFSON, D. Integrated Drug Product Development - From Lead Candidate Selection to Life-Cycle Management. In: *The PROCESS OF NEW DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT*. New York: Informa Healthcare, 2006. p 16-46.
- [5] NISHIOKA, S. A., SÁ, P. F. G. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Pesquisa Clínica no Brasil. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 52, n. 1, p. 60-62, 2006.
- [6] LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. III. The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
- [7] CHONG, R. C.; SULLIVAN, D. J.. New uses for old drugs. **Nature**, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.
- 8 PHARMACEUTICAL Drug. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Pharmaceutical_drug#cite_note-4>. Acesso em: 22 out. 2009.
- [9] ZHAO, H.; GUO, Z. Medicinal chemistry strategies in follow-on drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 9, p. 516-522, 2009.
- [10] HOPKINS, A. L., Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature Chem. Biol.**, v. 4, n. 11, 682-690, 2008.
- [11] 50 MILLIONTH Unique Chemical Substance Recorded In Cas Registry. Disponível em: <<http://www.cas.org/newsevents/releases/50millionth090809.html>>. Acesso em: 22 out. 2009.
- [12] LIPINSKI, C.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 855-860, 2004.
- [13] JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1813-1818, 2004.
- [14] XU, J., HAGLER, A. Chemoinformatics and drug discovery. **Molecules**, v. 7, n. 2, p. 566-600, 2002.

[15] CHEN, W. L. Chemoinformatics: past, present, and future. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 46, n. 6, p. 2230-2255, 2006.

[16] GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chem. Intel. Lab. Sys.**, v. 82, n. 1, p. 200-209, 2006.

[17] GHOSE, A. K.; HERBERTZ, T.; SALVINO, J. M.; MALLAMO, J. P. Knowledge-based chemoinformatic approaches to drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 23, p. 1107-1114, 2006.

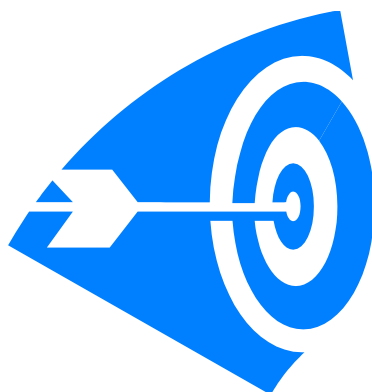
[18] BLEICHER, K. H.; BOHM, H. J.; MULLER, K.; ALANINE, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 5, p. 369-378, 2003.

[19] GHOSH, S.; NIE, A.; AN, J.; HUANG, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery. **Curr. Op. Chem. Biol.**, v. 10, n. 3, p. 194-202, 2006.

[20] LENGAUER, T.; LEMMEN, C.; RAREY, M.; ZIMMERMANN, M. Novel technologies for virtual screening. **Drug Discov. Today**, v. 9, n. 1, p. 27-34, 2004.

[21] SCHNEIDER, G.; FECHNER, U. Computer-based de novo design of drug-like molecules. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n. 8, p. 649-663, 2005.

CAPÍTULO 4



Objetivos

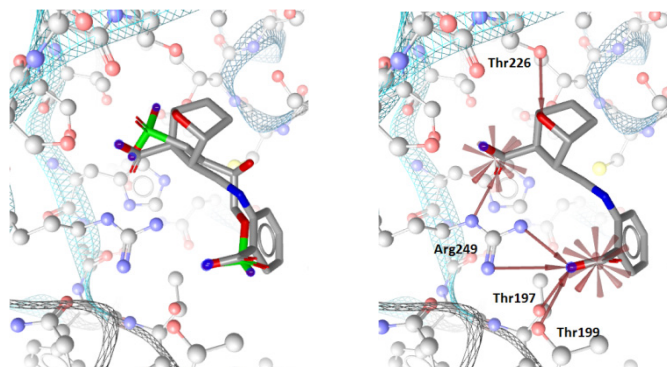
Os objetivos fundamentais desta tese de doutorado são apresentados neste capítulo.

4 – OBJETIVOS

Os principais objetivos dessa tese de doutorado são:

- ✓ Construção de um banco de dados contendo moléculas previamente testadas contra a GAPDH de *T. cruzi*
- ✓ Aquisição de uma coleção virtual de compostos disponíveis comercialmente para serem eventualmente adquiridos e avaliados como inibidores enzimáticos
- ✓ Aplicar filtros de seleção na coleção virtual para eliminar compostos que são reativos, potencialmente tóxicos e que apresentem propriedades farmacocinéticas indesejadas
- ✓ Realizar um planejamento baseado na estrutura do alvo visando a identificação de moléculas com características estruturais apropriadas para uma boa interação com o sítio da enzima
- ✓ Determinar as constantes cinéticas do substrato usando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC)
- ✓ Determinar as constantes de inibição dos compostos selecionados através do planejamento computacional usando a técnica de ITC
- ✓ Realizar estudos de inibição com os melhores compostos frente a enzima de coelho visando avaliar a seletividade desses compostos
- ✓ Avaliar a capacidade dos compostos em inibir as formas infectivas do *T. cruzi* (tripomastigota e amastigota)
- ✓ Selecionar classes de compostos para estudos de relação estrutura-atividade biológica (SAR)

CAPÍTULO 5



Planejamento computacional de novos inibidores da GAPDH de T. cruzi

Uma breve introdução sobre os métodos em quiminformática usados na seleção dos compostos é abordada neste capítulo. A estratégia e os critérios usados para selecionar os compostos também são apresentados.

5 – IDENTIFICAÇÃO E SELEÇÃO DOS COMPOSTOS

5.1 – Planejamento baseado na estrutura do receptor

5.1.1 – Docagem

A *docagem* é o método de planejamento baseado na estrutura do alvo mais usado hoje em dia tanto na indústria quanto na academia. Ela pode ser definida como uma tentativa de prever a estrutura do complexo formado entre um ligante (uma pequena molécula ou até mesmo uma proteína) e um receptor (enzima, DNA, canais iônicos, receptores, etc.)^[1]. Essa técnica é aplicada em diferentes estágios do processo de desenvolvimento de fármacos com o objetivo de cumprir três propostas principais: prever o modo de ligação de uma molécula conhecida, identificar novos ligantes usando o ensaio virtual e prever a afinidade da ligação de moléculas relacionadas a partir de uma série de ligantes ativos^[2]. Extensas coleções de moléculas, geralmente disponíveis comercialmente, são docadas na estrutura do alvo sob estudo por um programa computacional de docagem. Cada molécula é amostrada em milhares de possíveis configurações e pontuada com base na sua complementaridade com o alvo. De centenas de milhares de moléculas no banco de dados, as dezenas de ligantes mais bem pontuados são subsequentemente avaliados num ensaio experimental (Figura 5.1)^[3].

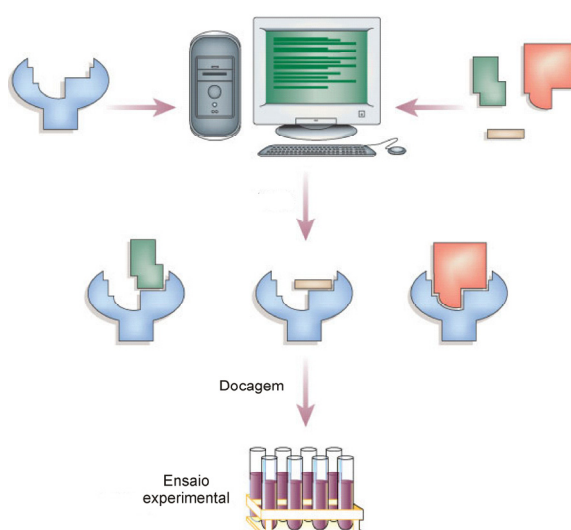


Figura 5.1 - Esquema representativo da docagem.

Os protocolos de docagem podem ser descritos como a combinação de dois componentes: um *algoritmo de busca* dos graus de liberdade configuracional e conformacional e uma *função de pontuação ou avaliação*^[4,5]. O algoritmo de busca deve exaustivamente elucidar todos os possíveis modos de ligação entre o ligante e o receptor. Os algoritmos mais amplamente usados podem ser agrupados nas seguintes categorias: métodos baseados em campos de força, tais como simulações de Dinâmica Molecular (MD) ou Monte Carlo (MC), métodos evolucionários (que empregam o algoritmo genético), métodos baseados em fragmentos (ou construção gradual) e métodos baseados na complementaridade ligante-receptor. Os programas DOCK, FlexX e Surflex pertencem a categoria dos métodos baseados em fragmentos, enquanto que o programa AutoDock é um representante dos métodos evolucionários.

Os algoritmos baseado em fragmentos, ou métodos de ancoragem e crescimento (anchor-and-grow), dividem o ligante em regiões rígidas e flexíveis. Uma ou mais âncoras rígidas são identificadas pela análise das ligações livres. Em seguida, essas âncoras são docadas em primeiro lugar e as partes flexíveis são adicionadas sequencialmente, com a varredura sistemática dos ângulos de torção.

O algoritmo genético usado no programa AutoDock usa a genética para resolver o problema da otimização na docagem do ligante no receptor. No caso da docagem, o arranjo particular do ligante e do receptor é definido por um conjunto de variáveis que descrevem a translação, orientação e a conformação do ligante com respeito ao receptor^[6]. Este conjunto é chamado de variáveis de *estado do ligante*, e cada variável de estado corresponde a um *gene*. O estado do ligante descreve o seu genótipo, enquanto que as coordenadas atômicas do ligante descrevem o seu “fenótipo”. O ligante é submetido a uma série de eventos genéticos como a seleção, cruzamento e mutação durante o processo de otimização^[7].

A função de pontuação deve ser capaz de distinguir os modos de ligação experimental entre todos os outros modos explorados através do algoritmo de busca. Usualmente, as funções de pontuação indicam a complementaridade estereoquímica e eletrostática entre o ligante e o alvo biomacromolecular. Essencialmente, existem três tipos ou classes de funções de pontuação que são aplicadas atualmente: funções de pontuação baseadas em campos de força, empíricas e baseadas no conhecimento. A primeira aplica a mecânica molecular clássica em funções energéticas^[5]. Essas funções aproximam a energia livre de ligação do complexo ligante-receptor como uma soma das energias de interações eletrostáticas e de van der Waals. O programa DOCK usa uma

função de pontuação baseada no campo de força AMBER. Nas funções de pontuação empíricas, a energia de ligação é essencialmente expressa como uma soma balanceada e explícita dos termos derivados de parâmetros estruturais, tais como as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas^[5]. O balanceamento dos termos dessas funções é derivado pelo ajuste dos valores determinados experimentalmente da *constante de inibição* (K_i) para o complexo ligante-receptor cuja estrutura cristalina tenha sido determinada. O programa AutoDock usa uma função de pontuação empírica derivada de uma regressão linear usando os valores de K_i de um conjunto de 30 complexos ligante-receptor. Já o programa FlexX estima a energia livre de ligação do complexo ligante-receptor usando também uma função de pontuação empírica baseada no trabalho de Böhm e Klebe^[21]. A função de pontuação usada no programa Surflex foi calibrada para estimar a afinidade de ligação ($-\log K_d$), de um conjunto de 34 complexos ligante-receptor^[8]. A terceira classe de funções de pontuação deve a sua existência ao massivo aumento do depósito de estruturas no *Protein Databank* (PDB)^[9]. Essas funções são construídas exclusivamente a partir de uma análise estatística da estrutura de complexos determinados experimentalmente, baseada na suposição de que as distâncias interatômicas que ocorrem com uma frequência maior que um dado valor médio deve representar contatos favoráveis, e vice-versa.

5.2 – Métodos Computacionais

Inicialmente foi feita uma busca no banco de dados PDB por estruturas cristalinas da enzima GAPDH de *T. cruzi* e de humanos. Foram selecionadas três estruturas: duas referentes à GAPDH do parasito (1K3T^[10], 1QXS^[11]) e a terceira referente à GAPDH de humanos (1U8F^[12]).

Na próxima etapa realizou-se a aquisição de uma coleção virtual com aproximadamente dois milhões de compostos com características fármaco-similar (drug-like) disponíveis no banco de dados de domínio público ZINC^[13]. Em seguida foi aplicada uma série de filtros de seleção nesse banco de dados utilizando o programa FILTER 2.0^[14]. Com isso, o banco de dados inicial foi reduzido para aproximadamente 100.000 moléculas. Essa etapa e as outras adotadas na seleção dos compostos está representada esquematicamente na Figura 5.2.

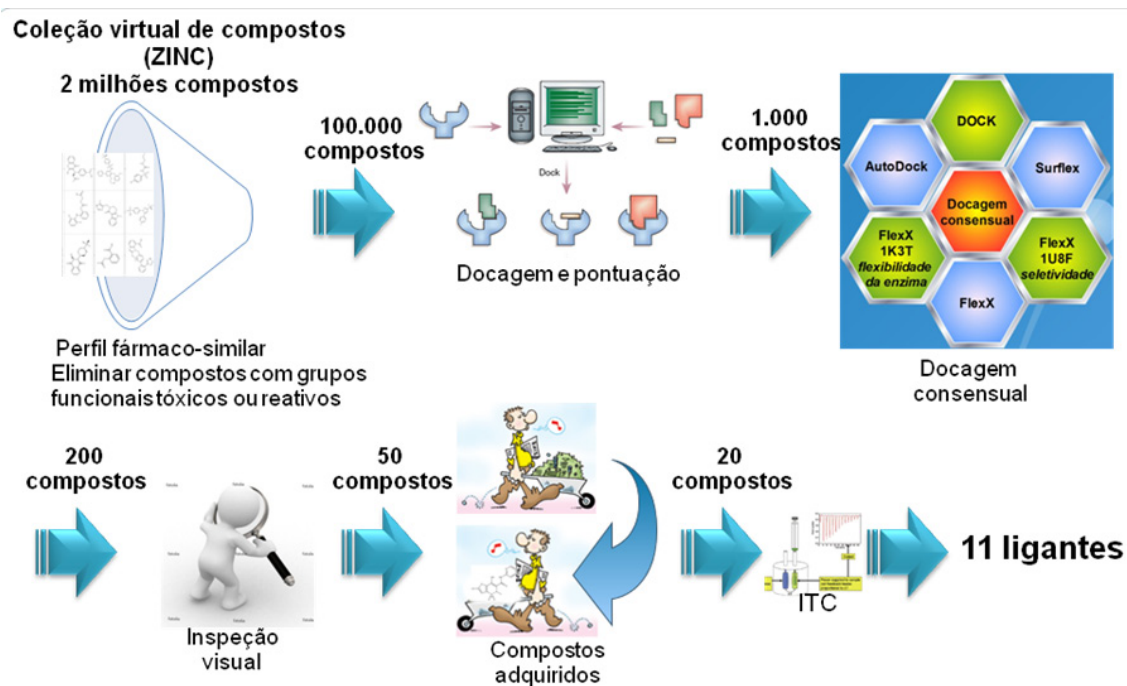


Figura 5.2 - Representação esquemática da estratégia usada na seleção dos compostos.

Usando a sub-coleção selecionada anteriormente, foi iniciado um planejamento baseado na estrutura do receptor usando a docagem. O programa DOCK5.4.0^[15,16] foi usado numa primeira etapa empregando as coordenadas cartesianas da estrutura 1QXS e a coleção de compostos. Todos os ligantes foram removidos, inclusive as moléculas de água e o cofator. O sítio ativo da enzima foi definido como o conjunto de aminoácidos

em que pelo menos um átomo estivesse numa distância ≤ 15 Å do ligante, no caso um análogo do produto da reação. Os átomos de hidrogênio e cargas parciais de Kollman foram adicionados à enzima usando o programa Chimera^[17]. Para os ligantes é necessária a adição das cargas parciais de Gasteiger-Marsili, contudo, estas já haviam sido previamente adicionadas pelos desenvolvedores do ZINC. Além da presença das cargas, os compostos obtidos junto ao banco de dados ZINC já estavam no estado de protonação mais provável para o pH 7,5, que é o pH em que os ensaios experimentais foram realizados. Em seguida, usando o programa dms^[18], foi gerada uma superfície molecular de Connolly^[19] para o alvo passando-se um átomo de prova com um raio de 1,4 Å. O programa SPHGEN^[15] foi usado para criar as esferas complementares à superfície da proteína num raio de 8 Å do ligante. Em seguida, o módulo *grid*^[20] do programa DOCK5.4.0 foi usado para gerar grades (grids) tridimensionais de 0,3 Å de resolução com o centro localizado sobre o ligante, as quais são necessárias para uma rápida avaliação no programa DOCK5.4.0. O tamanho da caixa escolhida para englobar as esferas selecionadas usou uma margem extra de 6 Å. Finalizada a etapa de preparação do sítio e dos ligantes iniciou-se a docagem flexível e subsequente minimização dos ligantes no sítio ativo da enzima, a qual foi mantida rígida.

As 18.000 moléculas mais bem pontuadas pelo programa DOCK5.4.0 foram selecionadas e docadas flexivelmente no sítio ativo das enzimas 1K3T, 1QXS e 1U8F usando o programa FlexX2.0^[21, 22] implementado no pacote SYBYL^[23]. Essas enzimas foram preparadas removendo-se os ligantes e as moléculas de água, assim como também foram adicionados átomos de hidrogênio e cargas parciais de Kollman na enzima. O sítio ativo englobou todos os resíduos de aminoácidos que contivessem pelo menos um átomo a uma distância ≤ 15 Å do ligante.

O programa Surfex2.0^[8] foi usado na próxima etapa para docar flexivelmente, no sítio ativo da enzima 1QXS, as 1.000 moléculas que apresentaram as melhores energias de interação com o alvo de acordo com a função de pontuação do programa FlexX2.0. Assim como anteriormente, o sítio ativo englobou todos os resíduos de aminoácidos que contivessem pelo menos um átomo a uma distância ≤ 15 Å do ligante. Os átomos de hidrogênio e cargas parciais de Kollman foram adicionados na enzima.

As 1.000 moléculas mais bem pontuadas pela função de pontuação do FlexX2.0 também foram docadas usando o programa AutoDock3.0.5^[6] e a estrutura da enzima 1QXS. Os átomos de hidrogênios polares assim como as cargas parciais de Kollman foram adicionados à enzima usando o pacote ADT^[24]. Em seguida os parâmetros de

solvatação foram determinados usando o programa auxiliar ADDSOL implementado no pacote ADT. Uma grade de 70 x 60 x 60 nas direções x, y e z, respectivamente, com 0,375 Å de espaçamento (centrada no ligante) foi usada para calcular os mapas energéticos para dez tipos de átomos [C, A (carbono aromático), B, Cl, F, H, O, N, S, P], usando o programa AUTOGRID. Todas as possíveis rotações livres dos ligantes foram identificadas usando o programa auxiliar AUTOTORS implementado no pacote ADT.

Após a docagem dos ligantes, foi realizada uma análise de *docagem consensual* das energias de interação das 1000 moléculas obtidas com os programas DOCK5.4.0, FlexX2.0, Surflex2.0 e AutoDock3.0.5 e as estruturas das enzimas 1K3T, 1QXS e 1U8F. Com isso, 200 moléculas foram selecionadas para uma inspeção visual, das quais 50 foram selecionadas. Finalmente, 20 compostos foram adquiridos e avaliados usando a técnica de calorimetria de titulação isotérmica (ITC), sendo que onze foram ativos.

5.3 – Resultados e Discussões

5.3.1 – Análise do sítio ativo da GAPDH

A porcentagem de *identidade* (mesma sequência primária de aminoácidos) e de *similaridade* (sequência primária de aminoácidos similares) obtidas com o alinhamento, usando o programa Align^[25], da estrutura do parasito (1QXS) com a enzima de humanos (1U8F) é de 50,3% e 66.7%, respectivamente (Figura 5.3.). A raiz quadrada do desvio médio (RMSD) entre os átomos de carbono alfa (C α) nas estruturas 1QXS e 1U8F é de 0,793 Å. Esses resultados indicam que a enzima do parasito compartilha elevada similaridade com a enzima de humanos. Na verdade, esses valores aumentam bastante (68,2 % e 80,8%, respectivamente) quando se considera apenas os resíduos situados a uma distância $\leq 15,0$ Å do ligante cristalizado na estrutura 1QXS.

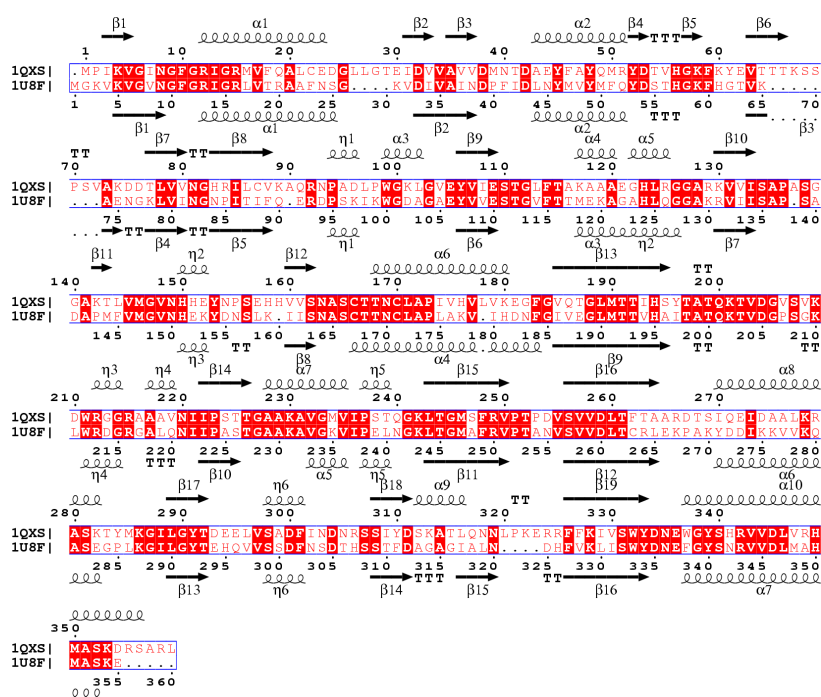


Figura 5.3 - Alinhamento das estruturas 1QXS e 1U8F.

Apesar da elevada similaridade entre a enzima de humanos e do *T. cruzi*, quatro resíduos do sítio ativo podem ser explorados na busca de ligantes seletivos pela enzima do parasito. Esses resíduos são a Ser247, Ser224, Asp210 e Gly213 que na enzima de humanos são Ala232, Ala209, Leu195 e Asp198, respectivamente (Figura 5.4). 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 entre a hidroxila das serinas e os ligantes. Além disso, a polarizabilidade do sítio ativo também muda, sendo este mais hidrofóbico na enzima de humanos em virtude da presença das alaninas.

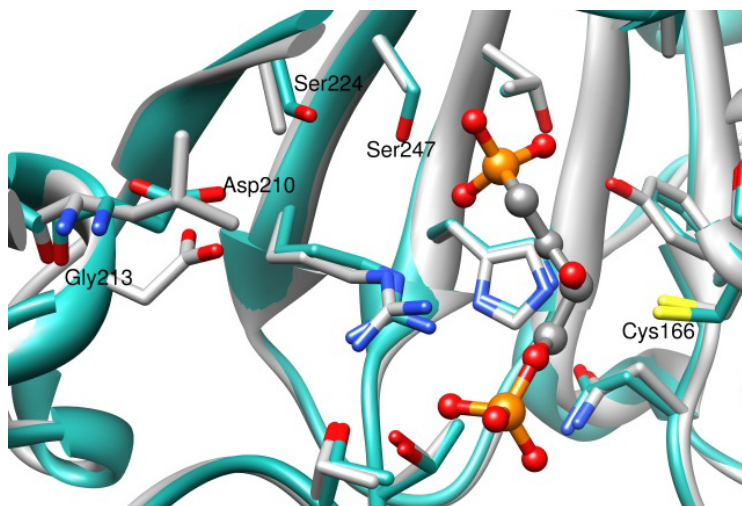


Figura 5.4 - Alinhamento das estruturas 1QXS (verde) e 1U8F (cinza) ilustrando os resíduos que podem ser explorados na busca de ligantes seletivos. A figura foi gerada com o programa Chimera^[26].

Na estrutura 1QXS, a enzima está complexada com um análogo do produto da reação que no caso é o ácido 3(R)-hidroxi-2-oxo-4-fosfonoxibutil-fosfônico (HOP) (Figura 5.5a). Conforme discutido anteriormente, o sítio ativo da GAPDH é extremamente hidrofílico, apresentando dois sub-sítios catiônicos (P_i e P_s) que estabilizam as cargas negativas do ligante através de cinco ligações de hidrogênio (Thr197, Thr199, Thr167, Ser247 e NAD^+) e duas interações eletrostáticas com a Arg249 (Figura 5.5b). Esse resíduo tem sido apontado como tendo um importante papel no processo catalítico, pelo fato de induzir a compressão do produto após a etapa de fosforilação, forçando a sua saída do sítio ativo. Na ausência do substrato o resíduo Arg249 forma uma forte interação eletrostática com um resíduo de asparagina (Asp210)^[7,27].

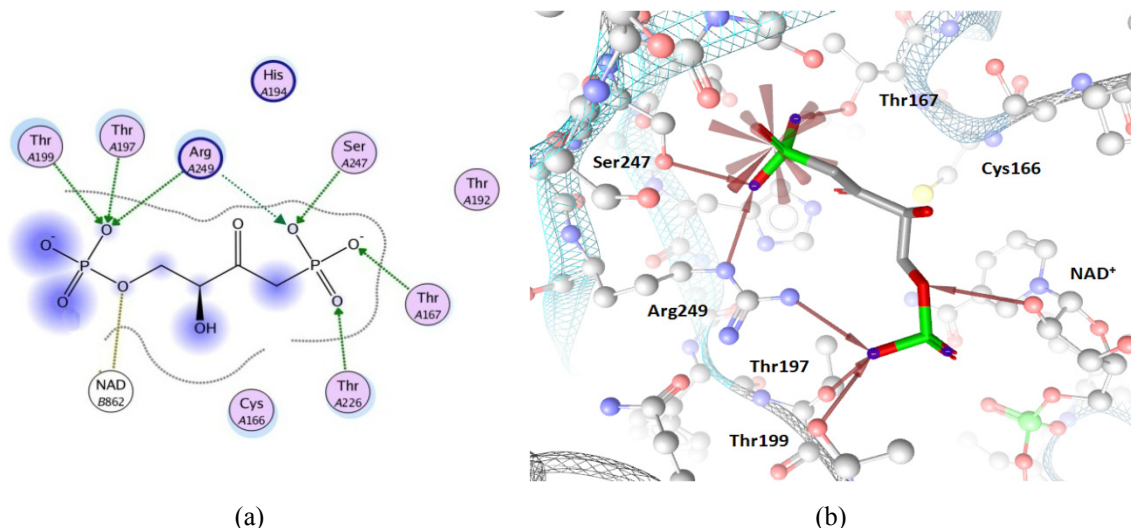


Figura 5.5 - (a) Representação bidimensional das interações do ligante no sítio da GAPDH de *T. cruzi*; (b) Representação tridimensional das interações que estabilizam o ligante no sítio da GAPDH de *T. cruzi*. A figura (a) foi gerada com o programa MOE^[28], enquanto que a figura (b) foi gerada com o programa LigandScout^[29].

5.3.2 – Filtros de Seleção

Para se tornar um fármaco, um composto necessita além de uma alta afinidade pelo alvo, também a incorporação de propriedades ADME/T (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) apropriadas^[30]. Muitos compostos não passam pela fase clínica em virtude de apresentarem propriedades farmacocinéticas inadequadas^[31]. A *regra dos cinco* (Ro5) de Lipinski prevê que uma baixa absorção ou permeação é mais provável quando o composto apresenta em média mais de 5 doadores em ligações de hidrogênio, 10 aceitadores de ligações de hidrogênio, massa molar maior que 500 Da e o coeficiente de partição (logP) maior que 5^[32]. Mais recentemente, Veber *et al.*, propôs um filtro que tem sido chamado de *regra dos dois*. Nas suas observações ele constatou que os compostos que preenchem apenas dois critérios – número de ligações livres ≤ 10 e área superficial polar (PSA) $\leq 140 \text{ \AA}^2$ – apresentaram uma boa biodisponibilidade oral em ratos^[33].

O programa FILTER foi usado para eliminar compostos indesejáveis do banco de dados antes do início da docagem. Esse programa tenta remover todos os possíveis compostos que são potencialmente tóxicos e/ou reativos. Embora existam regras gerais, a aplicação desses filtros depende do caso sob estudo, da facilidade da avaliação experimental, do alvo selecionado e da experiência do químico medicinal. O software é

bastante flexível e permite personalizar os critérios de filtragem de acordo com as necessidades requeridas.

O banco de dados selecionado nesse trabalho foi submetido a vários filtros de seleção, além dos propostos por Lipinski e Veber. Na tabela abaixo são mostrados os parâmetros das propriedades 1D que foram selecionados para a filtragem do banco de dados. Pode-se observar que o valor médio de todos os parâmetros estão dentro da faixa considerada ideal por Lipinski e Veber.

Tabela 5.1 - Alguns dos parâmetros usados na seleção das moléculas que tiveram seus valores padrões alterados.

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média
MW ¹	250	450	375
LOGP ²	0	5	3
HBA ³	0	7	5
HBD ⁴	0	6	3
PSA ⁵	0	150	90
RB ⁶	0	5	4

¹Massa molecular; ²Coefficiente de participação; ³Aceitadores em ligações de hidrogênio; ⁴Doadores em ligações de hidrogênio; ⁵Área superficial polar; ⁶Ligações livres.

Com o emprego do software FILTER o banco inicial que continha aproximadamente dois milhões de moléculas foi reduzido para 104.289 moléculas. Essa sub-coleção apresenta características mais próximas do conceito *matriz-similar* que fármaco-similar. Vários trabalhos apontam que as estruturas matriz-similares exibem na média uma menor complexidade molecular (massa molecular menor, número de anéis e ligações livres menores) e são menos hidrofóbicos (menor LogP e LogD)^[34]. Como são estruturalmente mais simples eles podem ser facilmente otimizados, gerando-se compostos com maior afinidade pelo alvo.

5.3.3 – Docagem consensual

O resultado obtido na docagem pode variar de acordo com as características do receptor e do programa escolhido. Em vista disso, surgiu a idéia de utilizar diferentes funções de pontuação para balancear os erros de uma única função e aperfeiçoar a probabilidade de identificar ligantes conhecidos, reduzindo a taxa de falsos positivos.

Essa estratégia é chamada de *pontuação consensual* (consensus scoring)^[35-37]. A sua realização envolve simplesmente a pontuação dos compostos usando uma função de pontuação primária, seguida de uma nova avaliação da melhor configuração (orientação/conformação) com outras funções de pontuação. Dessa forma, os compostos que irão ficar no topo da lista são aqueles que apresentarem as pontuações combinadas mais altas.

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 função de pontuação única. 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 *docagem consensual* (consensus docking)^[38]. Nessa aproximação vários métodos diferentes de docagem são usados, seguida 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 aproximação 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 seria a realização de uma docagem mais consistente e menos dependente do sítio ativo. Outro benefício seria a redução de falsos positivos que são menos prováveis de serem bem pontuados em relação aos compostos ativos por dois ou mais programas de docagem^[38]. Num recente trabalho, 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^[39].

A maior parte dos inibidores atualmente conhecidos da GAPDH de *T. cruzi* não são apropriados para serem usados na pontuação consensual. Isso porque o mecanismo de inibição desses compostos não é conhecido, já que apenas os valores de IC_{50} foram determinados. Além disso, vários deles inibem a enzima em concentrações elevadas ($IC_{50} \geq 100 \mu M$). Sendo que a principal vantagem da pontuação consensual é a possibilidade de identificar os ligantes conhecidos 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, o não cumprimento desses requisitos pode resultar em resultados estranhos como, por exemplo, uma molécula ativa apresentar uma pontuação pior do que a de um “composto isca”. Sendo assim, optamos por usar a docagem consensual na seleção *in silico* dos ligantes.

O protocolo adotado na docagem está representado na Figura 5.6. Partindo-se da coleção filtrada, a primeira docagem foi realizada com o programa DOCK usando a estrutura 1QXS. Nessa etapa, foram selecionadas as 18.000 moléculas mais bem pontuadas, as quais foram então docadas pelo programa FlexX. Como em todos os programas a enzima é mantida rígida durante a docagem, a *flexibilidade* do sítio ativo da GAPDH foi avaliada através da docagem das 18.000 moléculas, selecionadas na etapa anterior, usando a estrutura 1K3T e o programa FlexX (Figura 5.6). Na estrutura 1K3T a GAPDH de *T. cruzi* está cristalizada com a chalepina. Nessa estrutura, a Arg249 está disposta em uma posição bastante distinta da que é observada para esse mesmo resíduo na estrutura 1QXS.

Outro fator que foi levado em consideração durante a seleção de compostos é a *seletividade* pela enzima do parasito frente à enzima de humanos. Esse aspecto foi avaliado realizando-se a docagem das 18.000 moléculas selecionadas pelo programa FlexX no sítio ativo da estrutura 1U8F (GAPDH de humanos). Por fim, as 1.000 moléculas que exibiram a melhor complementaridade pelo sítio da estrutura 1QXS de acordo com o programa FlexX foram selecionadas e docadas usando os programas AutoDock e Surflex, tendo-se como alvo também a estrutura 1QXS (Figura 5.6).

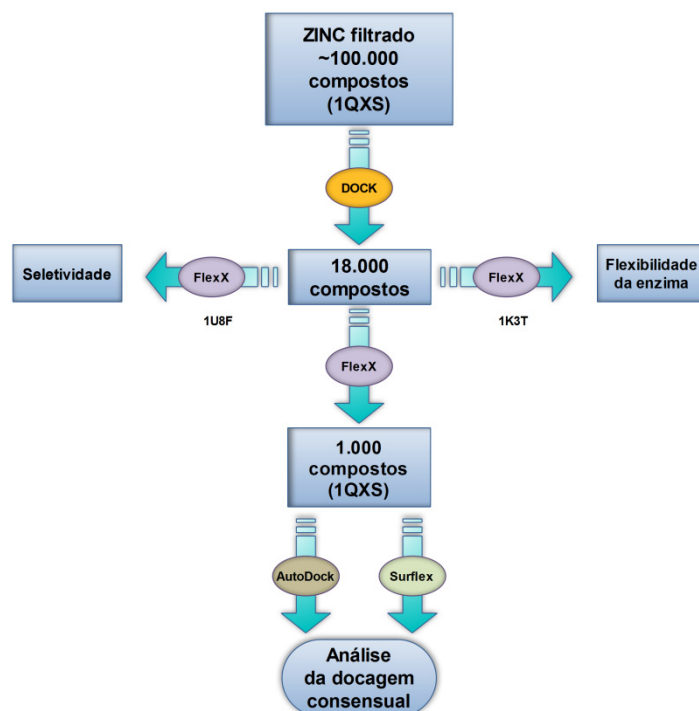


Figura 5.6 - Esquema ilustrativo das várias etapas de docagem realizadas.

Para avaliar se os ligantes selecionados por cada programa de docagem realmente apresentam uma complementaridade pelo sítio da GAPDH, a qual é quantificada pela energia de interação ligante-enzima obtida em cada programa, uma coleção de 123 compostos oriundos de produtos naturais e que já foram testadas contra a enzima GAPDH do *T. cruzi*^[40] (nesse trabalho essa coleção será denominada de *coleção teste*) também foi docada usando a estrutura 1QXS e cada um dos quatro programas de docagem. É possível observar na Tabela 5.2 que em todos os casos, os compostos selecionados apresentam uma energia de interação média superior à observada para os compostos da coleção teste, indicando que a complementaridade entre os compostos selecionados nesta tese e a GAPDH de *T. cruzi* é maior.

Tabela 5.2 - Comparativo entre a energia de interação das 1000 moléculas selecionadas pela docagem consensual e da coleção teste.

Programa	Compostos selecionados			Coleção teste		
	E_{\min}^1	E_{\max}^2	E_{med}^3	E_{\min}	E_{\max}	E_{med}
AutoDock (kcal mol ⁻¹)	-11,80	-1,12	-9,13	-18,37	-3,84	-8,64
DOCK (kcal mol ⁻¹)	-54,40	-3,92	-40,88	-68,85	-16,60	-35,26
FlexX (kJ mol ⁻¹)	-38,65	-28,55	-30,64	-30,04	-2,12	-17,72
Surflex	8,37	-0,40	4,34	7,18	0,91	4,13

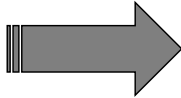
¹Melhor energia de interação; ²Pior energia de interação; ³Energia média de interação.

Como cada programa de docagem emprega uma função de pontuação própria, o valor máximo e mínimo da pontuação atribuída à mesma coleção de compostos difere significativamente. Por exemplo, no programa FlexX a unidade de pontuação de uma molécula é kJ mol⁻¹ enquanto que no programa AutoDock é kcal mol⁻¹. Sendo assim, antes de realizar a análise da docagem consensual é preciso *autoescalar* as energias de docagem (pontuação) para que o peso atribuído às diferentes funções de pontuação seja o mesmo^[41]. A seguinte fórmula foi usada no autoescalamento:

$$x_{\text{autoesc}} = \frac{x - x_{\min}}{x_{\max} - x_{\min}} \quad (1)$$

Onde x_{autoesc} é o valor da pontuação do composto x autoescalada (por exemplo, a pontuação autoescalada do composto de acordo com o programa do FlexX), x é o valor da pontuação original do composto x , x_{\min} é o melhor valor da pontuação original de um composto usando um determinado programa, x_{\max} é o pior valor da pontuação original de um composto usando um determinado programa. Usando essa estratégia, quanto menor for o valor da pontuação autoescalada, maior é a energia de interação ligante-receptor de acordo com um dado programa de docagem (Figura 5.7). Usando os valores autoescalados em vez de usar os valores originais, todas as pontuações se distribuem dentro do intervalo entre 0 e 1. Com isso, todas as funções de pontuação podem ser usadas simultaneamente na docagem consensual, independente das diferenças entre elas.

Composto	FLEX(kJ mol ⁻¹)	AUTODOCK(kcal mol ⁻¹)
1	-38,648	-10,68
2	-38,241	-10,24
3	-38,025	-10,29
4	-37,959	-9,95
5	-37,731	-8,88
6	-29,745	-11,8
7	-35,124	-11,66
8	-35,309	-11,55
9	-30,742	-11,53
10	-29,583	-11,53



Composto	FLEX	AUTODOCK
1	0,000	0,105
2	0,040	0,146
3	0,062	0,141
4	0,068	0,173
5	0,091	0,273
6	0,881	0,000
7	0,349	0,013
8	0,331	0,023
9	0,783	0,025
10	0,898	0,025

Figura 5.7 - Exemplo do processo de autoescalamento das pontuações atribuídas por dois programas de docagem.

Como foi dito anteriormente, além da docagem usando apenas uma estrutura cristalográfica da GAPDH de *T. cruzi*, a flexibilidade dessa enzima foi analisada realizando-se a docagem dos compostos selecionados em uma segunda estrutura cristalográfica (1K3T) da mesma enzima. Adicionalmente, a docagem dos compostos na enzima de humanos (1U8F) foi realizada com o intuito de obter moléculas “virtualmente” seletivas pela enzima do parasito. Para isso, a seguinte fórmula foi usada:

$$e_f = e_D^{QXS} + e_F^{QXS} + e_S^{QXS} + e_A^{QXS} + e_F^{K3T} - e_F^{U8F} \quad (2)$$

Onde e_f é a pontuação autoescalada final. Os quatro primeiros termos do lado direito da igualdade (e_D^{QXS} , e_F^{QXS} , e_S^{QXS} e e_A^{QXS}) são as pontuações das moléculas usando os programas DOCK, FlexX, Surfex e AutoDock, respectivamente, e a estrutura 1QXS como receptor. Já o termo e_F^{K3T} se refere à pontuação das moléculas usando o programa FlexX e a estrutura 1K3T como receptor. Por fim, o termo e_F^{U8F} corresponde à pontuação das moléculas usando o programa FlexX e a estrutura 1U8F como receptor. Todos os termos da equação acima foram obtidos a partir dos valores autoescalados. O objetivo da fórmula acima foi identificar os ligantes que fossem bem pontuados nas estruturas da GAPDH do *T. cruzi* (1K3T e 1QXS) e mal pontuadas na estrutura da GAPDH de humanos (1U8F). Por isso é que os termos referentes à enzima do parasito são positivos e o termo referente à enzima de humanos é negativo.

Analisando as 50 moléculas mais bem pontuadas de acordo com a docagem consensual observamos que 16, 30, 15 e 19 moléculas estavam posicionadas originalmente entre as 50 primeiras de acordo os programas DOCK, FlexX, Surfex e

AutoDock, respectivamente, e a estrutura 1QXS. Usando a estrutura 1K3T e o programa FlexX, cinco das moléculas que originalmente estavam entre as 50 mais bem pontuadas de acordo com esse programa continuam a estar nesse grupo após a docagem consensual. No caso da enzima de humanos, apenas duas continuaram entre as 50 melhores após a aplicação da docagem consensual. Outro importante resultado é que 80% (40 moléculas) das moléculas selecionadas não estavam nem entre as 1000 primeiras na enzima de humanos. Isso indica que com a estratégia adotada nesse trabalho fomos capazes de selecionar moléculas que apresentam uma complementaridade virtual bem superior pela enzima do parasito em detrimento da enzima de humanos.

5.3.4 – Análise visual

Após as etapas de filtragem, docagem, e análise consensual, um pequeno número de compostos (200) foi submetido a uma análise visual. Essa análise é uma das etapas cruciais no processo, já que nela é feita a seleção dos compostos que serão sintetizados/comprados para a avaliação experimental. Nessa etapa, a intuição química, o conhecimento e a experiência do químico medicinal devem ser usados para decidir quais os compostos apresentam as melhores características (complementaridade pelo sítio, interações e energia de interação) que justifiquem a sua seleção.

No presente trabalho os critérios utilizados na seleção dos compostos através da análise visual foram: (i) a correta formação de interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio com os resíduos do sítio ativo; (ii) o adequado posicionamento dos compostos no sítio ativo da GAPDH. As interações e a posição adotada pelo análogo do produto da reação, cristalizado com a GAPDH de *T. cruzi*, foram usadas para guiar a seleção dos compostos. A Figura 5.8 mostra dois compostos selecionados para o ensaio experimental seguindo os critérios adotados na análise visual. É possível observar que a posição adotada por esses compostos é bastante similar à observada para o análogo do produto. Além disso, as interações essenciais para a estabilização desse composto também estão presentes nos dois compostos selecionados.

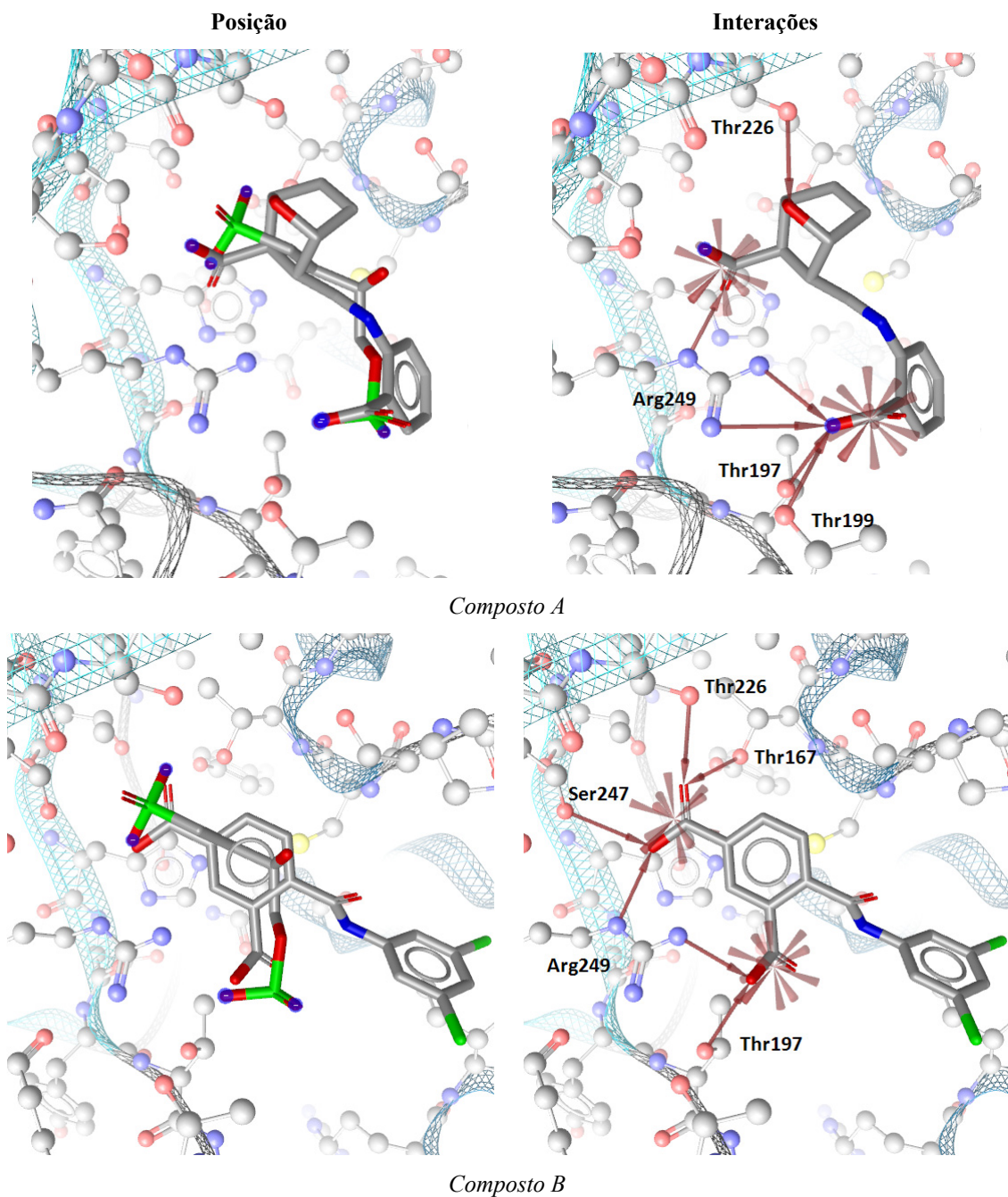


Figura 5.8 - Exemplo de dois compostos selecionados que apresentam o padrão adequado (para o posicionamento e as interações) adotado na análise visual. A figura foi gerada com o programa LigandScout^[29].

Seguindo os critérios adotados na seleção dos compostos, vinte foram escolhidos através da análise visual para serem adquiridos comercialmente. As estruturas desses compostos está representada na Figura 5.9, exceto a estrutura dos compostos **3**, **5** e **6**. Eles representam uma nova classe que inibiu significativamente as formas infectivas (tripomastigota e amastigota) do *T. cruzi* e por isso, estes compostos estão em processo de proteção patentária.

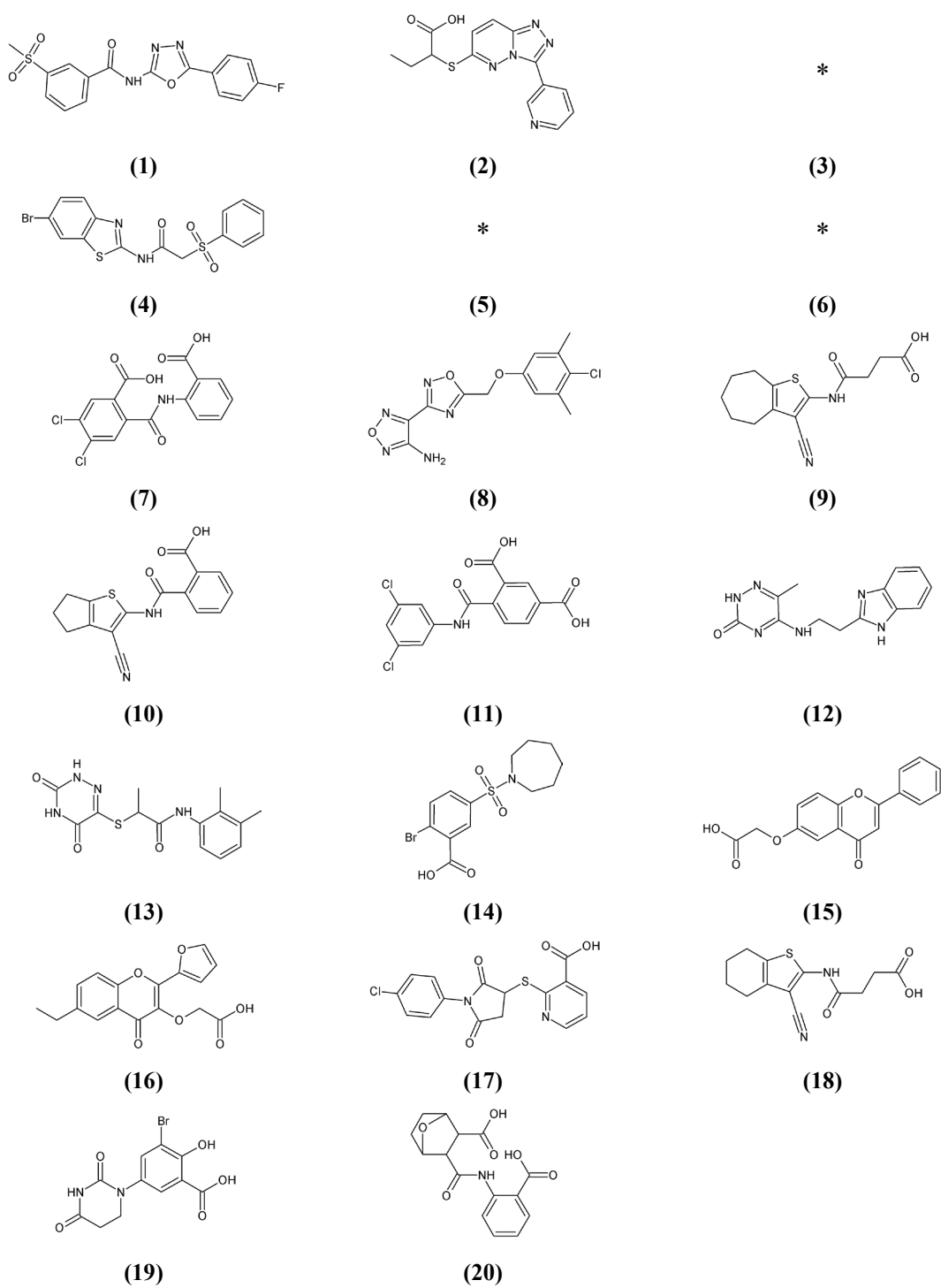


Figura 5.9 - Estrutura dos compostos selecionados para os ensaios experimentais. * Estruturas sob sigilo.

5.4 – Referências

- [1] BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 32, p. 335-373, 2003.
- [2] LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.
- [3] SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
- [4] TAYLOR, R. D.; JEWBUSRY, P. J.; ESSEX, J. W. A review of protein-small molecule docking methods. **J. Comput-Aided Mol. Des.**, v. 16, n. 3, p. 151-166, 2002.
- [5] RESTER, U. Dock around the clock – current status of small molecule docking and scoring. **QSAR Comb. Sci.**, v. 25, n. 7, p. 605-615, 2006.
- [6] MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Comp. Chem.**, v. 19, n.14, p. 1639-1662, 1998.
- [7] AMARO, R. E.; BARON, R.; MCCAMMON, J. W. An improved relaxed complex scheme for receptor flexibility in computer-aided drug design. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 22, n. 9, p. 693-705, 2008.
- [8] JAIN, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. **J. Med. Chem.**, v. 46, n. 4, p. 499-511, 2003.
- [9] 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 Res.**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.
- [10] PAVÃO, F.; CASTILHO, M. S.; PUPO, M. T.; DIAS, R. L.; CORREA, A. G.; FERNANDES, J. B.; DA SILVA, M. 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 Lett.**, v. 520, n. 1, p. 13-17, 2002.
- [11] LADAME, S.; CASTILHO, M. S.; SILVA, C. H.; 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. **Eur. J. Biochem.**, v. 270, n. 22, p. 4574-4586, 2003.
- [12] JENKINS, J. L.; TANNER, J. J. High-resolution structure of human D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallogr. Sect. D**, v. 62, n. 3, p. 290-301, 2006.
- [13] IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – a free database of commercially available compounds for virtual screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.

- [14] OPENEYE Scientific Software. **Filter v. 2.0.2**. [Programa de Computador]. Disponível em: <<http://www.eyesopen.com>>. Acesso em: 22 mar. 2006.
- [15] KUNTZ, I. D.; BLANEY, J. M.; OATLEY, S. J.; LANGRIDGE, R.; FERRIN, T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.
- [16] EWING, T. J.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A. G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **J. Comput.-Aided Mol. Des.**, v. 15, n. 5, p. 411-428, 2001.
- [17] 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. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [18] COMPUTER Graphics Laboratory. DMS. [Programa de Computador]. Disponível em: <<http://www.cgl.ucsf.edu/Overview/software.html#dms>>. Acesso em: 15 mai. 2006.
- [19] CONNOLLY, M. L. The molecular surface package. **J. Mol. Graph.**, v. 11, n. 2, p. 139-141, 1993.
- [20] MENG, E. C.; SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. **J. Comput. Chem.**, v. 13, n. 4, p. 505-524, 1992.
- [21] RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. **J. Mol. Biol.**, v. 261, n. 3, p. 470-489, 1996.
- [22] KRAMER, B.; RAREY, M.; LENGAUER, T. Evaluation of the FlexX incremental construction algorithm for protein-ligand docking. **Proteins Struct. Func. Gen.**, v. 37, n. 2, p. 228-241, 1999.
- [23] TRIPOS. SYBYL 7.3. [Programa de Computador]. St. Louis: [s.n], 2007, 1 CD-ROM.
- [24] The SCRIPPS Research Institute. **AutoDock Tools**. [Programa de Computador]. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>>. Acesso em: 15 mai. 2007.
- [25] EUROPEAN Bioinformatics Institute. EMBOSS Pairwise Alignment Algorithm. [Programa de Computador]. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>>. Acesso em: 15 out. 2009.
- [26] 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. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [27] 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.

[28] CHEMICAL Computing Group, MOE 2009. [Programa de Computador]. Quebec: [s.n], 2009, 1 CD-ROM.

[29] INTE:LIGAND, LigandScout v. 2.03. [Programa de Computador]. Viena: [s.n], 2009, 1 CD-ROM.

[30] BAURIN, N.; BAKER, R.; C. RICHARDSON, CHEN, I.; FOLOPPE, N.; POTTER, A.; JORDAN, A.; ROUGHLY, S.; PARRATT, M.; GREANNEY, P.; MORLEY, D.; HUBBARD, R. E. Drug-like annotation and duplicate analysis of a 23-supplier chemical database totalling 2.7 million compounds. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 44, n. 2, p. 643-651, 2004.

[31] KELLER, T. H.; PICHOTA, A.; YIN, Z. A practical view of "druggability". **Curr. Op. Chem. Biol.**, v. 10, n. 4, p. 357-361, 2006.

[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. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 23, n. 1, p. 3-25, 1997.

[33] 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. **J. Med. Chem.**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

[34] TEAGUE, S. J.; DAVIS, A. M.; LEESON, OPREA, T. The Design of lead-like combinatorial libraries. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 1999.

[35] 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. **J. Med. Chem.**, v. 42, n. 25, p. 5100-5109, 1999.

[36] FEHER, M. Consensus scoring for protein-ligand interactions. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 9, p. 421-428, 2006.

[37] CLARK, R. D.; STRIZHEV, A.; LEONARD, J. M.; BLAKE, J. F.; MATTHEW, J. B. Consensus scoring for ligand/protein interactions. **J. Mol. Graph. Model.**, v. 20, n. 4, p. 281-295, 2002.

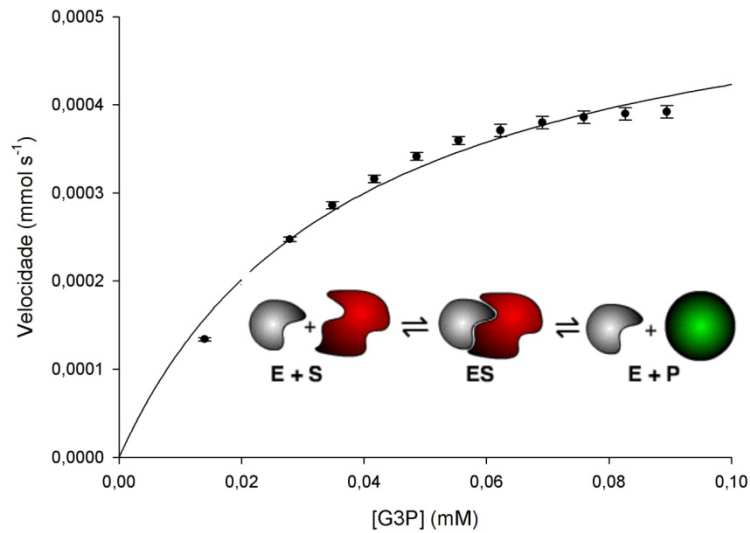
[38] MITEVA, M. A.; LEE, W. H.; MONTES, M. O.; BRUNO, O. V. Fast structure-based virtual ligand screening by combining FRED, DOCK and Surflex. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 19, p. 6012-6022, 2005.

[39] COZZA, G.; BONVINI, P.; POLLETTO, 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. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 8, p. 2363-2366, 2006.

[40] LEITÃO, A.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G.; PUPO, M. T.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERREIRA, V. F.; SÁ, M. M.; MORAES, V. R. S.; MONTANARI, C. A. Structure-activity relationships of novel inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Bioorg. Med. Chem. Let.**, v. 14, n. 9, p. 2199-2204, 2004.

[41] ODA, A.; TSUCHIDA, K.; TAKAKURA, T.; YAMAOTSU, HIRONO, S. Comparison of consensus scoring strategies for evaluating computational models of protein-ligand complexes. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 46, p. 380-391, 2006.

CAPÍTULO 6



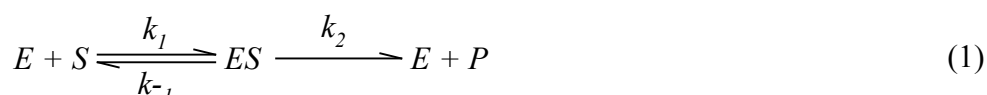
*Ensaaios cinéticos da GAPDH de *T. cruzi**

Neste capítulo é apresentada uma breve introdução a respeito da cinética enzimática e sobre a técnica de calorimetria de titulação isotérmica aplicada nos estudos de cinética enzimática. Em seguida, os resultados obtidos na determinação das constantes cinéticas do G3P e do cofator NAD^+ também são abordados.

6 – CINÉTICA ENZIMÁTICA

6.1 –A Equação de Michaelis-Menten

Brown em 1902 forneceu uma explicação qualitativa para as observações da dependência da velocidade da reação em relação ao substrato^[1]. De acordo com ele a reação catalisada por uma enzima pode ser descrita pelo seguinte esquema



Este esquema prevê que a velocidade da reação será proporcional à concentração do complexo ES: $v = k_2[ES]$. Suponha que a concentração da enzima seja mantida constante numa baixa concentração e que [S] seja variada. Em baixas [S] a concentração do complexo ES é diretamente proporcional à [S]; assim a velocidade exibe uma dependência em relação à [S] aparentemente de primeira ordem. Em elevadas [S], contudo, praticamente toda a enzima irá se apresentar na forma do complexo ES. Sob tais condições a velocidade depende da taxa de conversão de ES em E+P, liberando o produto e regenerando a enzima. A adição de mais substrato nessas condições não altera a velocidade da reação; assim a inclinação do gráfico da velocidade versus [S] se aproxima de zero^[1]. Embora o modelo de Brown fornecesse uma útil visão qualitativa das reações enzimáticas, faltava um tratamento matemático para ele. Isso foi feito primeiramente por Henri (1903) e subsequentemente por Michaelis-Menten (1913).

A teoria de Michaelis-Menten é baseada na suposição de que a enzima e seu substrato se associavam reversivelmente para formar um complexo enzima substrato (ES), como mostrado no esquema proposto por Brown^[2]. Assume-se que essa associação/dissociação atinge um equilíbrio de forma muito rápida, e K_s é a *constante de dissociação enzima-substrato*. No equilíbrio,

$$K_{-1}[ES] = K_1[E][S] \quad (2)$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_{-1}}{K_1} \quad (3)$$

As interpretações de Michaelis-Menten foram refinadas e ampliadas em 1925 por Briggs e Haldane, assumindo-se que a concentração do complexo ES rapidamente atinge um valor constante num sistema dinâmico^[2]. Isto é, ES é formado tão rapidamente a partir de E+S na mesma proporção em que ele desaparece a partir de duas maneiras: dissociando-se para regenerar E+S ou através da reação para formar E+P. Esta suposição é definida *aproximação do estado estacionário* e é expressa como

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (4)$$

Usando a aproximação do estado estacionário, com um pouco de álgebra é possível obter a *equação de Michaelis-Menten*^[1,2]. Essa equação descreve a velocidade da reação como uma função *hiperbólica* da [S], exibindo uma velocidade máxima e igual $k_{cat}[E_T]$ em concentrações infinitas do substrato.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}; V_{max} = k_{cat}[E_T] \quad (5)$$

Se um experimento for planejado de forma que a [S] seja exatamente igual ao valor de K_M , a Equação 5 se reduz para:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + [S]} = \frac{V_{max}}{2} \quad (6)$$

Isto fornece a definição operacional de K_M : *o valor de K_M é a concentração de substrato que fornece uma velocidade de reação que é a metade da velocidade máxima, obtida sob condições de saturação pelo substrato* (Figura 6.1)^[1,2].

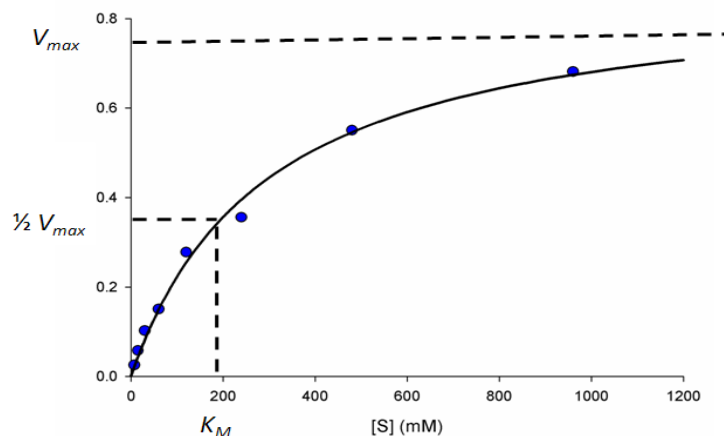


Figura 6.1 - Gráfico da velocidade da reação versus a concentração do substrato para uma reação catalisada por uma enzima. Essa curva apresenta a forma de uma hipérbole retangular e obedece a equação de Michaelis-Menten, da qual é possível se determinar os valores de K_M , k_{cat} e V_{max} .

6.2 – O significado de K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M

6.2.1 – K_M

Representa a concentração de substrato na qual metade dos sítios ativos da enzima na amostra estão ocupados por moléculas de substrato no estado estacionário^[1]. Geralmente, a constante K_M é tratada como se fosse uma *constante termodinâmica*, confundido seu valor com a constante de dissociação (K_s) do complexo ES. Contudo, as duas constantes não são iguais, mesmo nos esquemas de reações tratados aqui. Lembrando que K_s é definido pela razão de duas constantes de velocidade, este valor não é igual ao valor da expressão para K_M dado na Equação 5. Somente em condições específicas onde $k_2 \ll k_{-1}$ é que as constantes K_M e K_s são equivalentes. Nesse caso, apesar de K_M ser uma constante *estritamente cinética*, ele pode ser considerado como uma *medida relativa da afinidade de ligação* do substrato.

6.2.2 – k_{cat}

Se a concentração da enzima usada experimentalmente é conhecida, o valor de k_{cat} pode ser calculado diretamente pela divisão do valor de V_{max} por $[E_T]$. Essa

constante é chamada algumas vezes de *número de “turnover”* da enzima, já que ele define o número de eventos catalíticos que ocorre por unidade de tempo^[1,2].

O valor de k_{cat} define a velocidade máxima na qual a reação enzimática pode atingir numa concentração fixa de enzima e elevada concentração do substrato^[1]. Em virtude de k_{cat} estar relacionado às etapas químicas subsequentes à formação do complexo ES, mudanças nesse parâmetro, provocadas por alterações na enzima (por exemplo, a mutação de resíduos de aminoácidos específicos ou a comparação de enzimas diferentes), nas condições da solução (pH, força iônica, temperatura, etc.) ou na identidade do substrato (análogos estruturais, substratos marcados, etc.), definem perturbações que afetam as etapas da catálise enzimática^[1,3]. Em outras palavras, mudanças no valor de k_{cat} refletem perturbações no estado de transição da reação enzimática.

6.2.3 – k_{cat}/K_M

A eficiência catalítica de uma enzima é definida pela razão de constantes cinéticas, k_{cat}/K_M ^[1]. Essa razão possui unidades de uma constante de velocidade de segunda ordem e é geralmente usada para comparar a eficiência catalítica entre as enzimas. Também pode ser usada para comparar a eficiência enzimática de diferentes substratos por uma enzima em particular. Geralmente, em comparações desse tipo as maiores diferenças são observadas no valor de k_{cat} . Isto é porque a *especificidade* do substrato geralmente resulta de diferenças no *estado de transição*, mais do que no estado fundamental. Assim, a razão k_{cat}/K_M captura os efeitos de substratos diferentes em qualquer das constantes cinéticas e proporciona um limite inferior para que a constante de segunda ordem seja produtiva. Isto é, após a formação do complexo ES, este é levado a um estado de transição (ES*) e à eventual formação do produto. O valor de k_{cat}/K_M é, portanto considerado a melhor maneira de se medir a especificidade do substrato^[1].

6.2 – Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

6.2.1 - Calorímetro

A maioria dos calorímetros de titulação isotérmica usados são baseados em celas com sistema de retorno^[4], que mede os efeitos diferenciais do calor entre uma cela de referência (preenchida geralmente com tampão ou água) e uma cela de amostra (ou cela de reação) (Figura 6.2a). Isso é conhecido como energia compensatória diferencial. A diferença de temperatura entre as duas celas é constantemente monitorada e uma energia constante (definida pelo usuário) é aplicada na cela de referência, a qual ativa o circuito de retorno para aplicar uma quantidade de energia variável sobre a cela de amostra para manter uma diferença de temperatura entre as duas celas próxima de zero (Figura 6.2b).

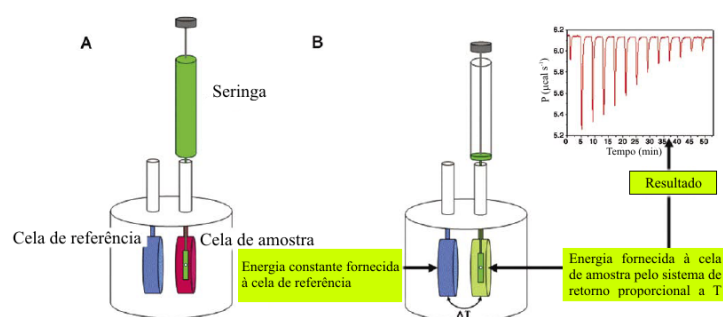


Figura 6.2 - Representação esquemática de um calorímetro de titulação isotérmica (ITC): (a) antes do início da titulação as celas de referência e amostra são mantidas na mesma temperatura. A cela de referência é mantida sempre na temperatura do experimento; (b) Durante a titulação, quando uma injeção é feita, ocorre uma variação na temperatura da cela de amostra. Com isso, há uma alteração na energia fornecida a esta cela, de modo a manter a diferença de temperatura entre as celas igual a zero.

A energia de retorno é o nível da linha base observado na ausência de qualquer reação^[4]. Quando uma reação ocorre, há uma alteração no valor da temperatura na cela de amostra, o que leva a uma diferença de temperatura entre as duas celas. Isto é detectado pelo calorímetro e a energia aplicada na cela de amostra é ajustada. O sinal observado num experimento calorimétrico é a energia fornecida a esta cela.

A velocidade de uma reação enzimática pode ser determinada medindo-se a variação na quantidade de energia que é fornecida pelo instrumento à cela de amostra após a adição do substrato ou da enzima através de uma seringa em constante agitação^[5]. Se a reação gera calor (exotérmica), o calorímetro precisa fornecer menos

energia para manter constante a temperatura, e uma deflexão na energia (linha base) é observada. Ao contrário, se a reação consome calor (endotérmica), o calorímetro precisa fornecer uma energia adicional para manter as condições isotérmicas, e uma inflexão é observada na energia.

6.2.2 – O uso da Técnica de ITC no Estudo da Cinética Enzimática

Uma reação química termodinamicamente favorável é espontânea desde que haja uma diminuição da energia livre, que é a soma de termos entálpico e entrópico ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). O componente entálpico é observado como *calor* (em condições de pressão constante). Assim, um método capaz de medir a *velocidade* da geração de calor acompanhando a conversão do substrato em produto irá proporcionar uma medida da velocidade de uma reação enzimática^[5]. O calor (Q) medido como uma função do tempo (dt) é definido como *potência térmica*:

$$E = \frac{dQ}{dt} \quad (7)$$

A quantidade de calor associado na conversão de n moles de substrato em produto é dada por

$$Q = n\Delta H_{app} = [P]_{total}V\Delta H_{app} \quad (8)$$

Onde V é o volume da solução na cela de amostra, $[P]$ é a concentração molar do produto gerado e ΔH_{app} é a entalpia molar aparente, que é experimentalmente determinada para a reação. A potência térmica gerada por uma enzima na conversão do substrato em produto é

$$E = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt}V\Delta H_{app} \quad (9)$$

Onde $d[P]/dt$ é igual à velocidade de formação do produto (*velocidade da reação*). Rearranjando a Equação 9 temos

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V\Delta H_{app}} \frac{dQ}{dt} \quad (10)$$

A Figura 6.3 mostra uma curva típica da velocidade de reação através do uso da técnica de ITC. Após a injeção do substrato, observa-se um pico inicial, nesse caso endotérmico, correspondente ao calor de diluição. A linha base então se estabiliza numa potência térmica menor que a observada antes da injeção (Figura 6.3, linha pontilhada). Isso ocorre porque certa quantidade de calor é gerada pela reação enzimática e, portanto, a energia necessária, fornecida pelo instrumento, para manter o equilíbrio térmico entre as celas de referência e amostra é menor. A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior, indicando que esta reação particular ocorre com entalpia negativa, ou seja, é uma reação exotérmica (Figura 6.3). Uma segunda injeção é feita e o processo se repete. A quantidade de calor gerado ($P_n = dQ_n/dt$) para cada concentração de substrato é proporcional à velocidade da reação.

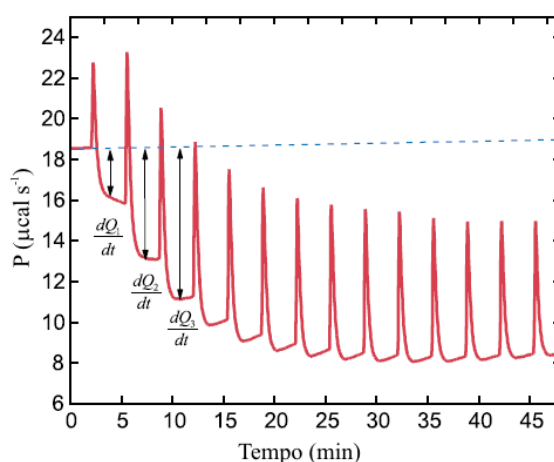


Figura 6.3 - Gráfico da potência térmica versus o tempo. A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação⁴.

A entalpia molar aparente da reação pode ser determinada permitindo-se que a reação se complete. A integração da área do sinal obtido fornece a quantidade total de calor (Q_r) gerado na reação. Na Figura 6.4a o substrato é injetado na cela de reação contendo uma elevada concentração de enzima. Após a injeção do substrato, há uma diminuição no valor da linha base, o que indica a natureza exotérmica da reação. Após todo o substrato ser consumido, a linha base retorna ao seu valor inicial. A integração da área descrita pela curva (menos o calor associado à diluição do substrato) fornece o valor de Q_r que é igual à entalpia aparente da reação:

$$\Delta H_{app} = \frac{1}{[S]_{total}V} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt} dt \quad (11)$$

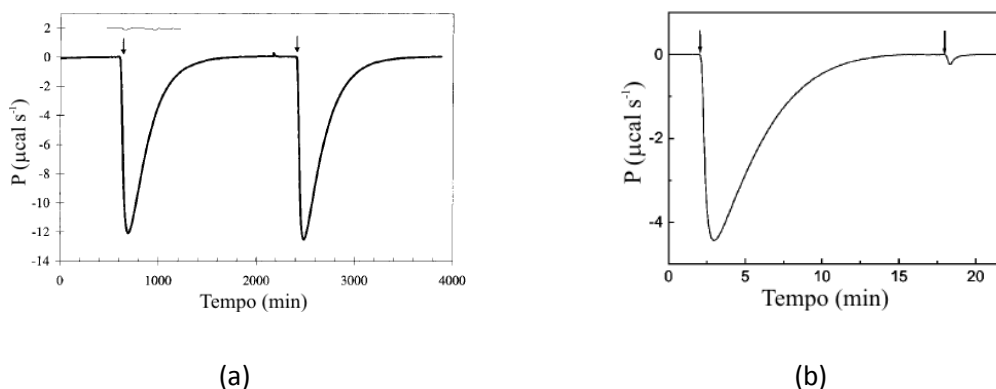


Figura 6.4 - Determinação da entalpia aparente da reação: (a) com o substrato na seringa e (b) com o substrato na cela^[5,6].

Após a reequilibração, uma segunda injeção do substrato na cela de amostra (agora contendo o produto da reação) fornece uma curva com a mesma forma e área, confirmando o valor de ΔH_{app} e evidenciando que a *inibição pelo produto* é desprezível. A entalpia molar aparente ($\Delta H_{app,molar}$) é obtida subtraindo-se o valor do calor de diluição do substrato (Q_d), o qual é obtido num experimento separado na ausência da enzima, do calor gerado na reação, e dividindo-se pelo número de moles do substrato presentes na cela de amostra

$$\Delta H_{app,molar} = \frac{Q_r - Q_d}{n} \quad (12)$$

Outra maneira de se determinar a entalpia aparente da reação é colocar a enzima na seringa numa concentração suficientemente elevada de modo que através de uma única injeção, a enzima seja capaz de converter todo o substrato presente na cela de amostra em produto^[7,8]. Após o termino da reação, uma segunda injeção é feita para se calcular o calor de diluição da enzima (Figura 6.4b).

Existem dois métodos que podem ser usados para medir os parâmetros cinéticos usando a técnica de ITC: *método das injeções múltiplas e método da injeção simples*. No método das injeções múltiplas são feitas várias injeções da solução do substrato (que está na seringa) na cela de amostra que contém a enzima. Após cada injeção, é fornecido um tempo suficiente para que a linha base se estabilize em um novo nível de potência térmica, resultante do aumento da concentração do substrato. Contudo, não mais que 5% do substrato pode ser consumido antes da próxima injeção. Nesse método, os valores medidos de v e $[S]$ são valores *discretos* medidos para cada injeção de substrato realizada. Além disso, a concentração de substrato usada é muito maior que a concentração da enzima ($[S] \gg [E]$), o que garante que a reação prossiga mantendo as condições do estado estacionário.

O método da injeção simples é uma estratégia alternativa para se obter os parâmetros cinéticos. Ele envolve o acompanhamento *contínuo* da velocidade da reação após uma única injeção do substrato (realizadas tipicamente em concentrações muito acima do valor de K_M). Quando o substrato é completamente consumido, a potência térmica retorna à linha base inicial. O valor de ΔH_{app} pode ser determinado pela integração da área descrita pela curva. Para um dado tempo t , a velocidade da reação pode ser determinada usando a Equação 10 e a concentração do substrato restante pode ser calculada a partir da integral do calor gerado (Equação 13). O gráfico da velocidade da reação como uma função da concentração do substrato fornece uma curva cinética *contínua*.

$$[S]_t = [S]_{t=0} - \frac{\int_{t=0}^t Q(t)}{\Delta HV} \quad (13)$$

6.3 – Materiais

Os reagentes D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P), trietanolamina (TEA), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), β -mercaptoetanol, arseniato de sódio ($\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

6.4 – Procedimento Experimental

Todos os experimentos de calorimetria de titulação isotérmica foram realizados num calorímetro VP-ITC da Microcal (Northampton, MA). Antes do início dos experimentos, lavou-se a cela de amostra e a seringa do calorímetro com 500 mL de uma solução água:detergente e em seguida com mais 500 mL de água.

O volume da cela de referência foi completado com água previamente degaseificada com agitação constante durante 5 minutos através do ThermoVac, que é uma bomba de vácuo com controle de temperatura fornecida pelo fabricante do calorímetro. 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 se eliminarem bolhas de ar da solução que provocam ruídos no sinal obtido pelo aparelho. Além disso, as soluções foram degaseificadas a uma temperatura 5°C inferior a que seria realizada no experimento. Com isso, evita-se que haja um tempo muito longo na estabilização térmica entre as celas de amostra e referência do calorímetro.

Uma seringa de 2,5 mL do tipo “gaslight” (Hamilton) foi usada para preencher as celas de amostra e de referência. Nesse caso, a seringa era inserida até que a agulha ficasse a cerca 2 mm de tocar o fundo da cela. A solução foi então 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 retirar bolhas que por ventura tivessem sido formadas. 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 μL . Esta foi preenchida lentamente, e em seguida purgada duas vezes novamente para eliminar

qualquer bolha. Após o preenchimento da seringa, a sua superfície apresenta pequenas gotas de líquido que 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 equilíbrio 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 do experimento foi de 25°C. A potência térmica ($\mu\text{cal s}^{-1}$) foi registrada como uma função do tempo. Os dados foram coletados pelo software VPViwer a cada 2 segundos.

6.4.1 – Determinação da entalpia aparente da reação catalisada pela enzima GAPDH

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), NaHAsO₄ 30 mM, D,L-gliceraldeído-3-fosfato 1 mM e NAD⁺ 1,5 mM. A seringa foi preenchida com a enzima GAPDH 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.

6.4.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima GAPDH

Os parâmetros cinéticos do G3P (K_M e k_{cat}) foram determinados de acordo com o protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório^[9]. A seringa foi preenchida com D,L-G3P 5 mM no tampão TEA-HCl 100 mM e pH 7,5. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO₄ 30 mM, NAD⁺ 1,5 mM e a enzima

GAPDH 5 nM. 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. O mesmo procedimento foi adotado no caso da adição de 5% de DMSO na cela de amostra.

O cofator da enzima GAPDH (NAD^+) também teve seus parâmetros cinéticos determinados. Nesse caso, a seringa foi preenchida com NAD^+ 5 mM no tampão TEA-HCl (100 mM; pH 7,5). A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO_4 30 mM, D,L-G3P 1 mM e a enzima GAPDH 5 nM. O substrato foi titulado sobre a enzima através de 15 injeções de 4 μL , com intervalos entre elas de 60 segundos.

Já a determinação dos parâmetros cinéticos do NAD^+ frente à adição de 5% de DMSO na cela de amostra foi feito preenchendo-se a seringa com uma solução de NAD^+ 10 mM no tampão TEA-HCl (100 mM; pH 7,5). Os componentes da cela de amostra foram usados nas mesmas concentrações com exceção da concentração da enzima (nesse caso foi de 10 nM) e da adição de 5% de DMSO. O substrato foi titulado sobre a enzima através de 15 injeções de 2 μL , com intervalos entre elas de 60 segundos.

6.4.3 – Análise dos dados

Todos os experimentos realizados nesse trabalho 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 7.0^[10] 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 10.0.1^[11] e as constantes K_M , k_{cat} e V_{max} foram determinadas através do ajuste não-linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten.

6.5 – Resultados e Discussões

6.5.1 – Determinação da entalpia aparente da reação

A entalpia aparente da reação foi determinada colocando-se a enzima na seringa numa concentração suficiente ($1,92 \mu\text{M}$) para que através de uma única injeção, todo o substrato ($[\text{D,L-G3P}] = 1 \text{ mM}$) presente na cela de amostra fosse convertido em produto (Figura 6.5). Após a estabilização da linha base a enzima foi injetada na solução e observou-se uma deflexão da linha base até o seu retorno ao valor inicial que se deu por volta de 25 minutos. A deflexão verificada após a injeção da enzima na solução evidencia que a reação catalisada pela GAPDH é exotérmica. Uma segunda injeção de enzima foi realizada 30 minutos após a primeira com o objetivo de verificar se a primeira injeção foi suficiente para consumir todo o substrato. Como pode ser verificada na Figura 6.5, a área correspondente a segunda injeção é bem inferior à primeira.

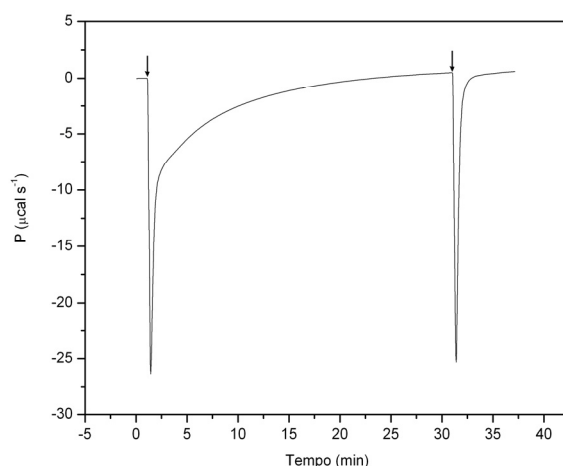


Figura 6.5 - Determinação da entalpia aparente da reação. As setas indicam o início das injeções.

Um segundo experimento para a obtenção da entalpia aparente da reação foi realizado sob as mesmas condições do primeiro. Constatou-se que os valores de Q_r nos dois casos são muito próximos, sendo que na primeira injeção do segundo experimento esse valor é um pouco maior (Tabela 6.1). Já em ambos os experimentos a diferença no valor de Q_d para a segunda injeção é desprezível.

Tabela 6.1 - Resultados obtidos na determinação da entalpia aparente da reação.

Experimento	Q (x 10^{-6} Kcal)		$\Delta H_{app, molar}$ (Kcal mol $^{-1}$)
	Q_r	Q_d	
1	-4,23	-0,80	-5,47 ± 0,91
2	-5,13	-0,79	
Média	-4,68 ± 0,63	-0,79 ± 0,01	

O número de moles de G3P na cela de amostra era de 0,71 μ mol.

O valor da entalpia molar aparente foi calculado usando-se a Equação 12, já descrita anteriormente, na qual os valores de Q_r (calor de reação) e Q_d (calor de diluição) foram tomados como sendo a média entre a primeira e a segunda injeção, respectivamente. O número de moles do substrato na cela de amostra era de 0,71 μ mol. Como o experimento foi realizado a pressão constante e as variações de volume são desprezíveis, é possível considerar o calor gerado na reação como sendo igual à entalpia molar aparente, que teve o seu valor calculado igual a $-5,47 \pm 0,91$ Kcal mol $^{-1}$.

Para serem farmacologicamente ativos, os inibidores enzimáticos devem apresentar certas propriedades físico-químicas que incluem certo grau de lipofilia da molécula^[3]. Desse modo, os compostos orgânicos em geral possuem baixa solubilidade em água. Para que moléculas deste tipo sejam testadas, usualmente é preparada uma solução estoque do composto em um solvente aprótico.

Como a tolerância das enzimas frente à adição de co-solventes varia de enzima para enzima, a determinação da concentração do solvente não aquoso que é tolerado sem diminuir a atividade da enzima em particular é uma etapa crítica no desenvolvimento de um protocolo visando o ensaio de inibidores enzimáticos^[3]. Um dos solventes apróticos mais usados é o dimetilsulfóxido (DMSO).

Num trabalho anteriormente realizado em nosso grupo, foi feita a avaliação do efeito de co-solventes na atividade enzimática da GAPDH e foi observado que na presença de 5% de DMSO a reação ocorre com uma maior eficiência enzimática^[9]. Como todos os ensaios de inibição enzimática que serão apresentados nesta tese foram realizados na presença de 5% de DMSO, a determinação da entalpia molar aparente e também das constantes cinéticas foi realizada na presença desse solvente.

A entalpia molar aparente da reação foi determinada na presença de 5% de DMSO seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os valores obtidos para o calor de reação, Q_r , e de diluição, Q_d , (obtidos a partir de dois experimentos) foram iguais a $-3,32 \pm 0,32$ μ cal mol $^{-1}$ e $-0,06 \pm 0,06$ μ cal mol $^{-1}$, respectivamente. Com base nesses valores, a entalpia molar aparente da reação na presença de 5% de DMSO

foi determinada como sendo igual a $-4,60 \pm 0,37 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Comparando esse valor com o obtido na Tabela 6.1, observa-se que na presença de DMSO essa constante é cerca de 1 Kcal mol^{-1} menor do que quando o co-solvente não estava presente. Além disso, a entalpia de diluição na ausência do co-solvente é cerca de 1000 vezes maior. Dessa forma pode-se propor que o DMSO absorve parte do calor gerado tanto na reação quanto também na diluição da GAPDH. Comparando-se os valores da entalpia molar aparente calculado neste trabalho com aquele publicado anteriormente ($-7,36$ e $-5,76 \text{ Kcal mol}^{-1}$ na ausência e presença de 5% de DMSO, respectivamente^[9]), nota-se que agora os valores são ligeiramente menores.

6.5.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos para o gliceraldeído-3-fosfato (G3P)

Na Figura 6.6a observa-se a o completo ensaio calorimétrico da enzima GAPDH em função do G3P. Após a estabilização da linha base, verifica-se uma inflexão desta até a sua nova estabilização em um nível inferior. Esse decréscimo da potência térmica fornecida pelo instrumento indica que a reação de conversão substrato em produto é exotérmica. Esse processo é repetido nas próximas injeções, até que a enzima fique totalmente saturada com o substrato (em torno da 11ª injeção).

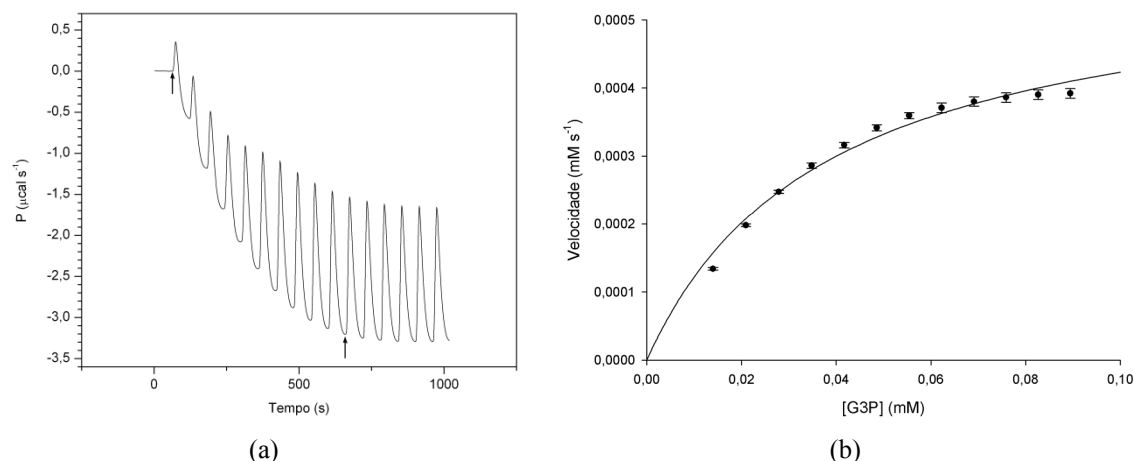


Figura 6.6 - (a) Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH. As setas indicam a 1ª e a 11ª injeção; (b) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,97$).

Medindo-se a diferença entre a linha base original e a nova linha base após a adição do substrato (Figura 6.6a), obtém-se o valor da potência térmica gerada para cada injeção, a qual é proporcional à velocidade da reação. Sendo assim, após várias

injeções do substrato, a curva completa de Michaelis-Menten da reação foi obtida (Figura 6.6b). A velocidade da reação foi corrigida pelo valor de $\Delta H_{app,molar}$ calculado anteriormente. O ponto relativo à primeira injeção foi excluído devido à dificuldade em obter valores reprodutíveis. Os dados foram ajustados à curva de Michaelis-Menten (Equação 6) através da regressão não linear dos mínimos quadrados usando o programa SigmaPlot. Uma série de três experimentos foi realizada para se obter as constantes cinéticas. Destes experimentos, os valores de K_M , k_{cat} e V_{max} foram calculados e estão dispostos na Tabela 6.2 junto com alguns parâmetros estatísticos que atestam a qualidade do modelo. A constante de Michaelis-Menten calculada está de acordo com a que foi encontrada anteriormente por nosso grupo ($K_M = 39,30 \pm 3,90 \mu\text{M}$)^[9].

Tabela 6.2 - Constantes cinéticas calculadas para o G3P, na ausência e na presença de 5% de DMSO.

Parâmetros	Sem DMSO		Com DMSO	
	Valor	Intervalo de confiança de 95%	Valor	Intervalo de confiança de 95%
V_{max} (x $10^{-3} \text{ mM s}^{-1}$)	0,58 ± 0,20	0,54 a 0,62	1,00 ± 0,01	1,02 a 1,08
K_M (μM)	37,80 ± 3,14	31,26 a 44,30	10,30 ± 0,69	8,90 a 11,72
k_{cat} (s^{-1})	116,60 ± 3,90	108,3 a 124,9	209,40 ± 2,90	203,50 a 215,40
k_{cat}/K_M (x $10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	3,08		20,90	
R^2	0,97		0,94	

Os parâmetros cinéticos do G3P também foram determinados na presença de 5% de DMSO. Observa-se na Tabela 6.2 que o K_M da enzima diminuiu cerca de quatro vezes na presença de DMSO. Considerando que o K_M pode ser considerado uma medida aproximada da afinidade da enzima pelo substrato, esses resultados sugerem que a afinidade da enzima pelo substrato aumentou na presença do co-solvente. Possivelmente a sua presença promoveu uma saída das moléculas de água da superfície da enzima próxima do sítio ativo, facilitando o encontro da enzima e do substrato. A constante catalítica (k_{cat}) e a velocidade máxima (V_{max}) também aumentaram. Como o k_{cat} está relacionado com o estado de transição da reação enzimática, a presença do DMSO pode ter contribuído para diminuir a energia de ativação do estado de transição e assim, aumentar a velocidade da reação.

6.5.3 – Determinação dos parâmetros cinéticos para a adenina nicotinamida dinucleotídeo (NAD^+)

Na Figura 6.7 observa-se a curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH com o NAD^+ na seringa (Figura 6.7a). Finalizada a estabilização da linha base, o experimento é iniciado pela injeção de NAD^+ na cela de amostra dando início à reação. Observa-se uma inflexão da linha base até a sua nova estabilização em um nível inferior. Como constatado anteriormente, há um decréscimo da potência térmica fornecida pelo instrumento indicando que a reação de conversão substrato em produto é exotérmica. Esse processo é repetido nas próximas injeções, até que a enzima fique totalmente saturada com o substrato (em torno da 11ª injeção).

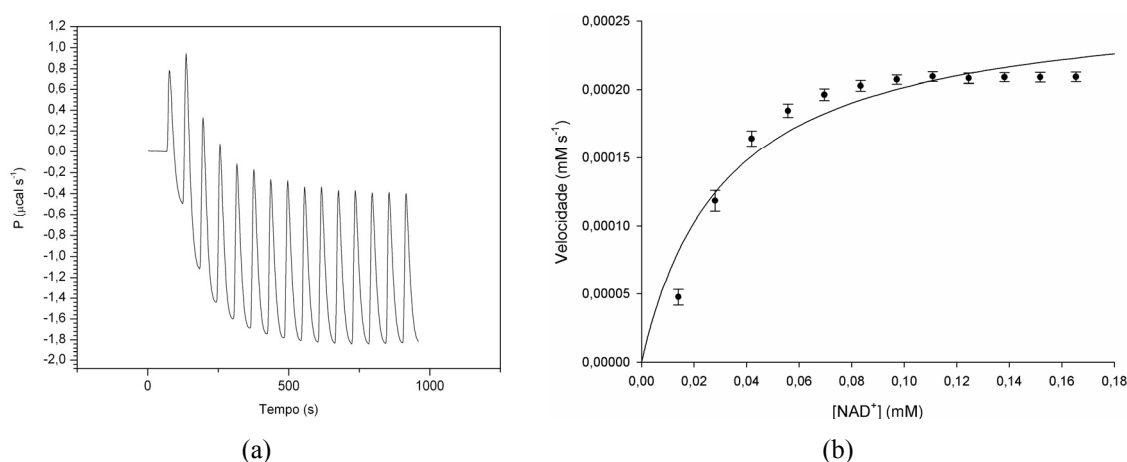


Figura 6.7 - Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH para determinar as constantes cinéticas do NAD^+ ; (b) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,89$).

A partir da diferença entre a linha base original e a nova linha base após a adição do substrato (Figura 6.7a), obtém-se o valor da potência térmica gerada para cada injeção. Dessa forma, após várias injeções do substrato, a curva completa de Michaelis-Menten da reação foi obtida (Figura 6.7b). Os dados foram ajustados à curva de Michaelis-Menten usando o método de regressão não linear empregando o programa SigmaPlot (Figura 6.7b). A velocidade da reação foi corrigida pelo valor de ΔH_{app} calculado anteriormente. Os valores de K_M , k_{cat} e V_{max} foram calculados e estão dispostos na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Constantes cinéticas calculadas para o NAD⁺, na ausência e na presença de 5% de DMSO.

Parâmetros	Sem DMSO		Com DMSO	
	Valor	Intervalo de confiança de 95%	Valor	Intervalo de confiança de 95%
V_{max} (x 10 ⁻⁴ mM s ⁻¹)	2,66 ± 0,09	2,48 a 2,83	3,89 ± 0,07	3,76 a 4,03
K_M (μM)	31,86 ± 3,74	24,29 a 39,43	14,44 ± 1,40	11,54 a 17,33
k_{cat} (s ⁻¹)	53,18 ± 1,76	49,60 a 56,73	77,90 ± 1,30	75,21 a 80,59
k_{cat}/K_M (x 10 ⁶ s ⁻¹ M ⁻¹)	1,67		5,39	
R ²	0,89		0,93	

Comparando-se os valores da Tabela 6.2 e 6.3, é possível notar que o K_M do NAD⁺ é um pouco menor que o do G3P, sugerindo que a enzima possui uma afinidade ligeiramente maior pelo NAD⁺. Além de exibir uma maior afinidade pela enzima, Copeland *et al.* mostraram que a incubação da GAPDH com o G3P não evita que a enzima perca rapidamente a sua atividade. Já quando a incubação é feita com NAD⁺ 1mM não foi observada redução na atividade da enzima por um período de 2 horas^[12]. Esse resultado indica que o NAD⁺ é importante para manter a enzima na conformação ativa.

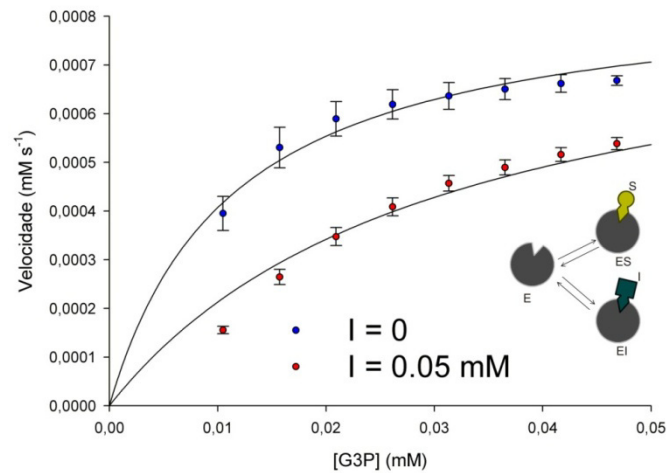
A cinética da reação em função do cofator NAD⁺ também foi acompanhada na presença de 5% de DMSO. Analisando-se a Tabela 6.3 em comparação com a Tabela 6.2, verifica-se que a constante de Michaelis-Menten para o NAD⁺ diminuiu na presença do co-solvente, assim como observado para o G3P. A velocidade máxima apresentou um ligeiro aumento implicando também no aumento dos valores de k_{cat} e k_{cat}/K_M .

Considerando o efeito do co-solvente no valor de K_M para o G3P (10,30 μM) e para o NAD⁺ (14,44 μM), observa-se que o K_M do primeiro é um pouco menor. Esse comportamento é oposto ao observado anteriormente na ausência de DMSO, e sugere que o DMSO provoca mudanças conformacionais na enzima de forma a aumentar a sua afinidade pelo G3P.

6.6 – Referências

- [1] COPELAND, R. A., **Enzymes**: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis, New York: Wiley-VCH, 2000. 397 p.
- [2] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Enzyme kinetics. In: **BIOCHEMISTRY**, London: Hardcover, 1999. p. 426-459.
- [3] COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. New Jersey: Wiley-VCH, 2005. 296 p.
- [4] HAQ, I. The use of ITC for obtaining enzyme kinetics constants. Disponível em: <<http://www.microcal.com/documents/enzymekineticsappnote.pdf>>. Acesso em: 01 jan. 2007.
- [5] TODD, M. J.; GÓMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity? **Anal. Biochem.**, v. 296, p. 179-187, 2001.
- [6] BIANCONI, M. L. Calorimetric determination of thermodynamic parameters of reaction reveals different enthalpic compensations of the yeast hexokinase isozymes. **The Journal of Biol. Chem.**, v. 278, p. 18709-18713, 2003.
- [7] WILLIAMS, B. A.; TOONE, E. J. Calorimetric evaluation of enzyme kinetic parameters. **J. Org. Chem.**, v. 58, p. 3507-3510, 1993.
- [8] LONHIENNE, T.; BAISE, E.; FELLER, G.; BOURIOTIS, V.; GERDAY, C. Enzyme activity determination on macromolecular substrates by isothermal titration calorimetry: application to mesophilic and psychrophilic chitinases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1545, p. 349-356, 2001.
- [9] 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. **Anal. Biochem.**, v. 37, p. 107-114, 2007.
- [10] EDWARDS, P. M. Origin 7.0: Scientific Graphing and Data Analysis Software. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 42, p. 1270-1271, 2002.
- [11] SYSTAT SOFTWARE. **Sigmaplot 10**. [Programa de Computador]. Richmond: [s.n], 2006, 1 CD-ROM.
- [12] COPELAND, L.; ZAMMIT, A. Kinetic properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the host fraction of soybean root nodules. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 312, p. 107-113, 1994.

CAPÍTULO 7



Estudos de inibição enzimática da GAPDH de T. cruzi

Uma breve introdução sobre inibidores enzimáticos reversíveis é apresentada neste capítulo. Em seguida, os resultados obtidos nos estudos de inibição enzimática são discutidos. A análise das impressões digitais das interações inibidor-enzima e a discussão sobre a eficiência do ligante dos inibidores também é abordada.

7 – INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

7.1 – Inibidores reversíveis

Inibidores podem atuar ligando-se *irreversivelmente* a uma enzima e tornando-a permanentemente inativa. Isto ocorre tipicamente através da formação de uma ligação covalente entre algum grupo do inibidor e um resíduo de aminoácido na enzima^[1]. Também, alguns inibidores se ligam tão fortemente numa enzima que eles são considerados por todas as razões práticas como permanentemente ligados (isto é, as suas velocidades de dissociação são muito lentas). Estes inibidores formam uma classe especial conhecida como inibidores fortemente ligados (*“tight binding”*)^[1]. Contudo, os inibidores mais comuns são aqueles que se ligam *reversivelmente* a uma enzima e apresentam velocidades de associação/dissociação muito rápidas. Moléculas que se comportam dessa forma são conhecidas como *inibidores reversíveis*^[1,2].

7.1.1 – Inibição Competitiva

A inibição competitiva se refere ao caso em que o inibidor se liga exclusivamente na enzima livre^[1,2]. Nesse tipo de inibição, os dois ligantes (inibidor e substrato) competem pela mesma forma da enzima e geralmente se ligam em sítios mutuamente exclusivos; isto é, a enzima livre se liga ou com o substrato ou com o inibidor, mas nunca com ambos (Figura 7.1a)^[1]. Nesse tipo de inibição, o inibidor usualmente apresenta alguma similaridade estrutural com o substrato ou com o estado de transição da reação.

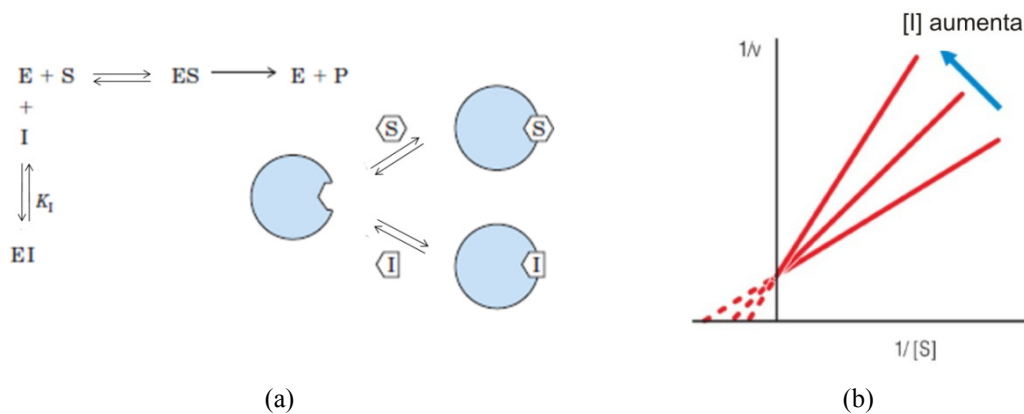


Figura 7.1 - (a) Representação esquemática da inibição competitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor competitivo.

Uma atividade residual é observada quando há população de enzima livre. Essas moléculas de enzima irão catalisar a reação normalmente, exibindo a *mesma velocidade máxima*^[1,2]. A competição entre o substrato e o inibidor, contudo, tem o efeito de *aumentar a concentração do substrato* requerida para atingir a metade da velocidade máxima. Ou seja, o inibidor competitivo provoca um *aumento* no valor da *constante de Michaelis-Menten aparente* (K_M^{app}) por um fator de $(1 + [I]/K_i)$ como pode ser verificado na Equação 1^[1,2].

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)} \quad (1)$$

O efeito provocado pelo inibidor competitivo é visível no gráfico de Lineweaver-Burk, onde a interseção com o eixo Y é constante e igual a $1/V_{max}$, mas a inclinação das retas (K_M/V_{max}) e a interseção com o eixo X (correspondente à $-1/K_M$) se alteram com a variação de [I]. Assim, um gráfico duplo-recíproco composto de várias linhas que se interceptam no eixo Y é diagnóstico de inibição competitiva^[1,2] (Figura 7.1b).

7.1.2 – Inibição Não-competitiva

Na inibição não-competitiva, os inibidores exibem uma afinidade tanto pela enzima livre quanto pelo complexo *ES*. Isso porque, como o próprio nome já diz, eles não competem com o substrato para se ligarem na enzima livre já que eles se ligam na

enzima numa região distinta do sítio ativo^[1] (Figura 7.2a). Assim, o efeito de um inibidor não-competitivo é o de *diminuir* o valor de V_{max} sem afetar o valor de K_M . Isto é refletido na equação de velocidade para um inibidor não-competitivo.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (2)$$

No gráfico duplo-recíproco, o efeito provocado pelo inibidor não-competitivo mostra que tanto a interseção com o eixo Y quanto a inclinação das retas (K_M/V_{max}) varia de acordo com a [I]. Todas as retas interceptam o eixo X (correspondente à $-1/K_M$) no mesmo ponto independente da [I] (Figura 7.2b). Assim, um gráfico duplo-recíproco composto de varias linhas que interceptam o eixo X é diagnostico de inibição não-competitiva^[2].

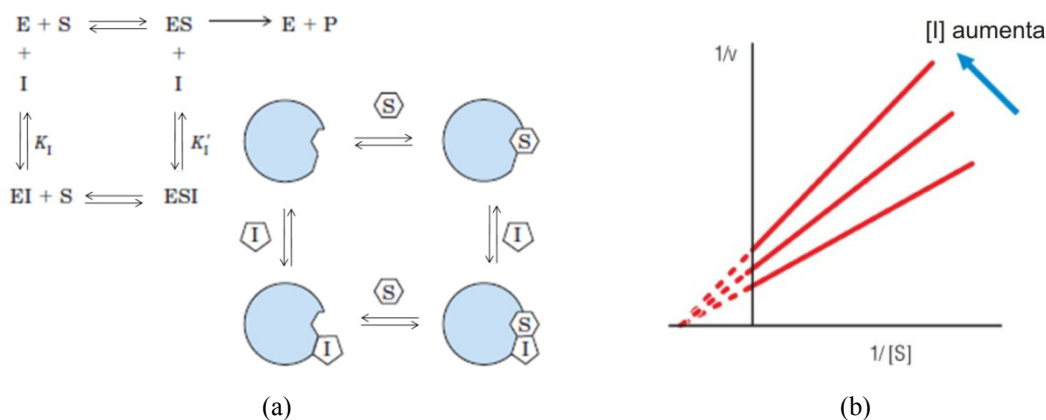


Figura 7.2 - (a) Representação esquemática da inibição não-competitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor não-competitivo.

7.1.3 – Inibição Incompetitiva

Um inibidor incompetitivo se liga exclusivamente no complexo ES, ou nas espécies subsequentes, com baixa ou nenhuma afinidade pela enzima livre^[2] (Figura 7.3a). Inibidores dessa modalidade necessitam da formação prévia do complexo enzima-substrato para se ligarem e exercerem seus efeitos.

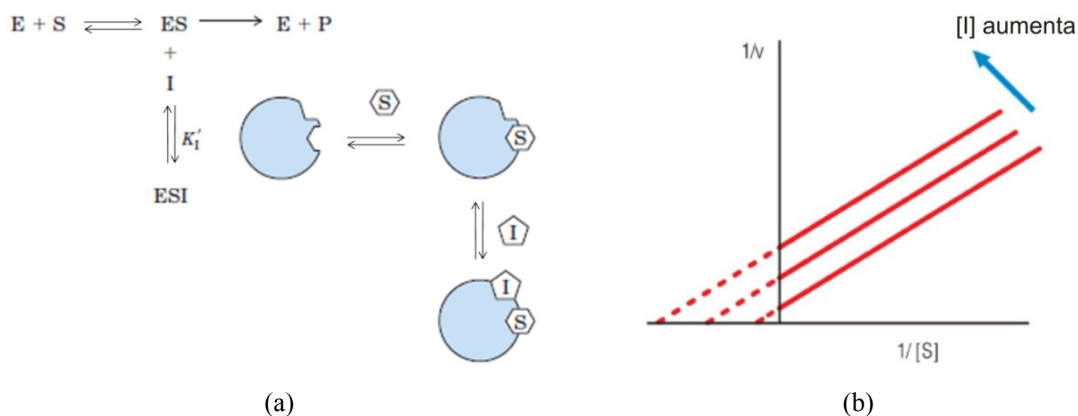


Figura 7.3 - (a) Representação esquemática da inibição incompetitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor incompetitivo.

Como a formação do complexo ESI representa um ciclo termodinâmico entre os estados ES, EI e ESI, o aumento da afinidade do inibidor pelo complexo ES deve ser balanceado por um aumento da afinidade do substrato pelo complexo EI. O resultado disso é que ambos os valores *aparentes* de V_{max} e K_M *diminuem* com a concentração crescente do inibidor incompetitivo. A equação de velocidade para esse tipo de inibição é

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right) + K_M} \quad (3)$$

Num gráfico de Lineweaver-Burk a diminuição do valor aparente de V_{max} é refletida através de diferentes intercessões no eixo Y para concentrações crescentes do inibidor incompetitivo. A inclinação das retas proporciona a determinação de K_M/V_{max} , que são afetados igualmente na presença de um inibidor incompetitivo^[1,2]. Assim, o termo $(1+[I]/\alpha K_i)$ é cancelado na razão K_M/V_{max} , o que indica que a inclinação das retas é constante para todas as concentrações do inibidor (Figura 7.3b). Assim como no caso do eixo Y, também a intercessão com o eixo X varia com a concentração do inibidor, fornecendo diferentes valores para o termo $-1/K_M$, evidenciando-se que também o valor de K_M aparente diminui na inibição incompetitiva (Figura 7.3b).

7.4 – Materiais

Os reagentes D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P), trietanolamina (TEA), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), β -mercaptoetanol, arseniato de sódio ($\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Os compostos selecionados (20) foram adquiridos de três empresas (Life-Chemicals, Otava e Specs) e avaliados como possíveis inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Trypanosoma cruzi*.

7.5 – Procedimento Experimental

7.5.1 Estudos da inibição enzimática

A avaliação dos compostos selecionados como possíveis inibidores da enzima GAPDH foi realizada preenchendo-se a seringa com D,L-G3P 5 mM no tampão TEA-HCl (100 mM; pH 7,5). A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO_4 30 mM, NAD^+ 1,5 mM, 5% de DMSO e a enzima GAPDH 5 nM. Os compostos foram adicionados à cela de amostra numa concentração final de 50 μM . Em seguida, a enzima foi titulada com o substrato através de 16 injeções, sendo a primeira de 2 e o restante de 4 μL , com intervalos entre elas de 60 segundos. Um experimento controle (na ausência do inibidor) foi realizado antes de cada ensaio de inibição seguindo o mesmo protocolo. Todos os dados foram analisados usando o programa SigmaPlot 10.0.1^[3] e as constantes de inibição aparente (K_i^{ap}) foram determinadas através da regressão não-linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten na ausência e na presença do inibidor.

7.6 – Resultados e Discussões

7.6.1 – Estudos da inibição enzimática

Os compostos que seriam testados tiveram as suas solubilidades teóricas calculadas usando o programa SciFinder^[4]. Apesar de alguns serem teoricamente solúveis, a maioria apresentava uma baixa solubilidade em água e optou-se então, por preparar soluções estoque desses compostos dissolvendo-os em DMSO puro.

Antes que os compostos pudessem ser testados, um problema teve que ser resolvido: o decréscimo da atividade enzimática com o passar do tempo (Figura 7.4). É possível observar na Figura 7.4 que em uma série de três experimentos realizados no mesmo dia, apesar do valor de K_M se manter constante entre os experimentos, o valor de k_{cat} diminui entre os experimentos sucessivos. Isso indica que a quantidade de enzima cataliticamente ativa é menor.

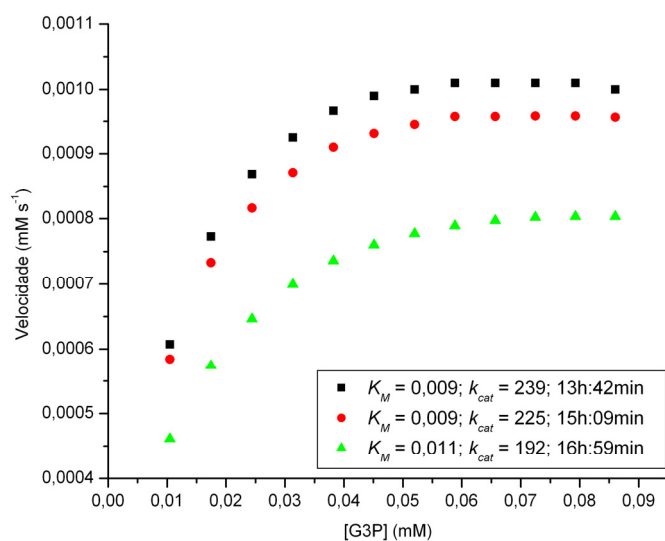


Figura 7.4 - Evidência de que a enzima perde a atividade ao longo do tempo.

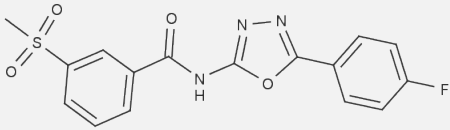
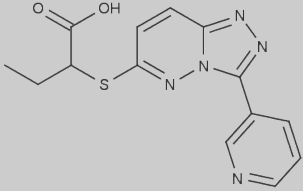
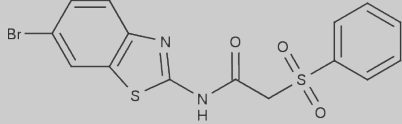
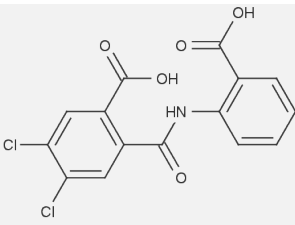
A forma encontrada para contornar esse problema foi realizar um experimento controle (na ausência do inibidor) e em seguida o ensaio de inibição. Em pequenos intervalos de tempo (± 1 hora) a atividade da enzima se mantém aproximadamente estável e assim é possível avaliar a constante de inibição em relação ao experimento controle. Dessa forma garante-se que as alterações na velocidade e no K_M que por ventura acontecem sejam atribuídas apenas ao efeito do inibidor.

Os dados obtidos nos ensaios de inibição foram adquiridos a partir de experimentos realizados pelo menos em duplicata (tanto para o controle como para o ensaio de inibição). Esses dados foram analisados usando o programa SigmaPlot e ajustados às equações referentes aos mecanismos de inibição competitiva, não-competitiva e incompetitiva. A decisão sobre qual mecanismo é mais apropriado para cada composto foi feita com base na análise dos parâmetros estatísticos dos modelos e na forma das curvas obtidas experimentalmente.

7.6.2 – *Compostos ativos*

Dos vinte compostos testados, a maioria deles (sete no total) mostraram-se inibidores competitivos da enzima GAPDH em relação ao G3P. Inibidores dessa modalidade se ligam exclusivamente na enzima livre e competem com o substrato pelo mesmo sítio ativo. Assim, a enzima livre se liga ou com o substrato ou com o inibidor. O efeito disso, é que a concentração necessária de substrato para que a reação alcance metade da velocidade máxima aumenta. Ou seja, o inibidor competitivo provoca um aumento no valor de K_M . Os resultados obtidos estão de acordo com a afirmação acima, já que para todos os compostos listados na Tabela 7.1, o valor de K_M aumentou na presença deles, confirmando o mecanismo de inibição competitiva.

Tabela 7.1 - Afinidade (K_i^{ap}) e o efeito dos inibidores competitivos nos parâmetros cinéticos (K_M , V_{max}) da reação.

Composto	K_M (μM)	V_{max} ($\times 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$)	K_i^{ap} (μM)	Mecanismo
 (1)	$21,84 \pm 4,28$ ($9,73 \pm 0,72$)*	$11,38 \pm 0,74$ ($11,16 \pm 0,17$)	$45,11 \pm 7,19$	competitivo
 (2)	$23,07 \pm 4,46$ ($10,11 \pm 0,92$)	$12,49 \pm 0,83$ ($11,22 \pm 0,22$)	$81,93 \pm 18,08$	competitivo
S** (3)	$20,62 \pm 2,93$ ($8,63 \pm 0,68$)	$13,02 \pm 0,60$ ($11,51 \pm 0,18$)	$91,50 \pm 18,66$	competitivo
 (4)	$12,27 \pm 0,77$ ($7,75 \pm 0,89$)	$11,35 \pm 0,21$ ($11,06 \pm 0,28$)	$112,80 \pm 18,15$	competitivo
S (5)	$19,55 \pm 2,29$ ($8,55 \pm 0,65$)	$13,02 \pm 0,48$ ($11,36 \pm 0,17$)	$124,83 \pm 28,63$	competitivo
S (6)	$25,53 \pm 4,54$ ($11,57 \pm 1,32$)	$15,36 \pm 0,99$ ($13,03 \pm 0,35$)	$155,50 \pm 51,61$	competitivo
 (7)	$17,30 \pm 3,19$ ($8,48 \pm 0,89$)	$7,80 \pm 0,42$ ($6,88 \pm 0,14$)	$182,87 \pm 78,76$	competitivo

* Os valores em parênteses foram obtidos na ausência do inibidor; ** Sigilo

Como o inibidor e o substrato competem pelo mesmo sítio de ligação na enzima, um aumento na concentração do último tem o poder de neutralizar o efeito do primeiro. Ou seja, o K_M aparente aumenta na presença do inibidor, conforme pode ser visto na Figura 7.5. Outra característica da inibição competitiva fica evidente na análise do gráfico de Michaelis-Menten: a velocidade máxima não se altera na presença de um inibidor competitivo (Figura 7.5), como pode ser observado para os dois melhores inibidores competitivos (compostos **1** e **2**, respectivamente).

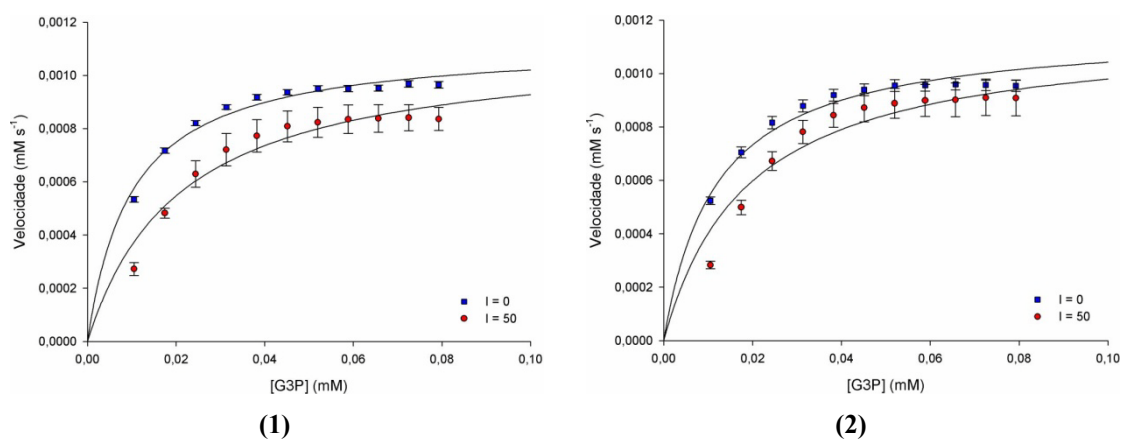
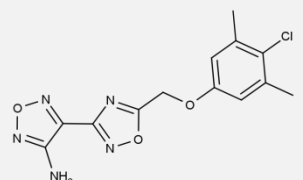
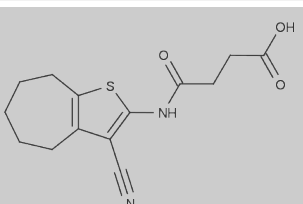
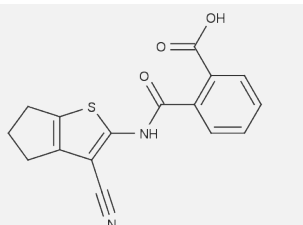
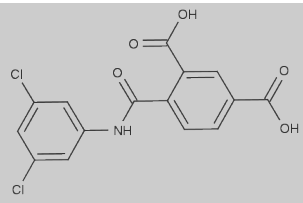


Figura 7.5 - Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores **1** e **2**. Pode-se observar nessa curva o aumento no valor de K_M aparente na presença do inibidor. Contudo, a velocidade máxima não se altera.

O composto **1** pertence a classe 1,3,4-oxadiazol-sulfonil-benzamida e inibiu a enzima com um K_i^{ap} igual a 45,11 μM . Já o composto **2** é um representante da classe triazolo-piridazina e inibiu a GAPDH com um K_i^{ap} igual a 81,93 μM . Os outros quatro compostos inibiram a enzima pelos mecanismos não-competitivo (composto **9**) e incompetitivo (compostos **8**, **10** e **11**) (Tabela 7.2).

Tabela 7.2 - Afinidade (K_i^{ap}) e o efeito dos inibidores não-competitivos (composto **9**) e incompetitivos (compostos **8**, **10** e **11**) nos parâmetros cinéticos (K_M , V_{max}) da reação.

Composto	K_M (μM)	V_{max} ($\times 10^{-4} \text{ mM s}^{-1}$)	K_i^{ap} (μM)	Mecanismo
 (8)	$6,43 \pm 0,51$ $(10,81 \pm 0,69)$	$6,84 \pm 0,09$ $(10,80 \pm 0,15)$	$89,28 \pm 2,72$	incompetitivo
 (9)	$9,93 \pm 0,97$ $(8,28 \pm 0,44)$	$7,84 \pm 0,16$ $(8,57 \pm 0,09)$	$386,17 \pm 32,91$	não-competitivo
 (10)	$7,40 \pm 0,61$ $(9,07 \pm 0,69)$	$7,59 \pm 0,11$ $(8,31 \pm 0,13)$	$692,90 \pm 117,11$	incompetitivo
 (11)	$6,74 \pm 0,92$ $(7,68 \pm 1,24)$	$8,43 \pm 0,19$ $(9,02 \pm 0,26)$	$854,93 \pm 307,61$	incompetitivo

Na Figura 7.6 estão representados as curvas de Michaelis-Menten para o melhor inibidor incompetitivo (composto **8**) e para o único inibidor não-competitivo (composto **9**). Inibidores incompetitivos se ligam exclusivamente no complexo ES, com praticamente nenhuma afinidade pela enzima livre. Em virtude desse fato, esses inibidores provocam uma diminuição nos valores aparentes tanto do K_M quanto do V_{max} (Figura 7.6a). Dos três compostos, o que mais foi efetivo em inibir a GAPDH foi o composto **8** que com um K_i^{ap} igual a $89,28 \mu\text{M}$. Vale ressaltar que esse composto apresenta um anel amino-1,2,5-oxadiazol ligado diretamente num anel 1,2,4-oxadiazol. Esse fragmento também está presente no composto **1**, que é um dos inibidores mais potentes encontrado usando o planejamento computacional realizado nesse trabalho. Possivelmente este seja um fragmento molecular que é reconhecido pela GAPDH.

O K_M na ausência e na presença do composto **9** é o mesmo. Contudo, como é típico do mecanismo de inibição não-competitiva, no gráfico de Michaelis-Menten a velocidade máxima (V_{max}) na presença do inibidor é menor (Figura 7.6b). Isso já era esperado, já que o inibidor não-competitivo se liga na enzima em um sítio distinto do sítio ativo.

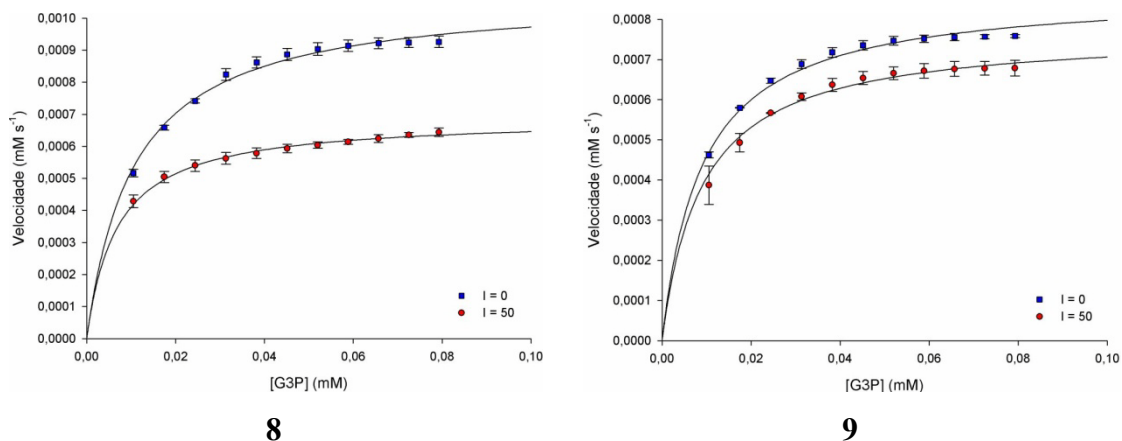


Figura 7. 6 - Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores **8** (incompetitivo) e **9** (não-competitivo).

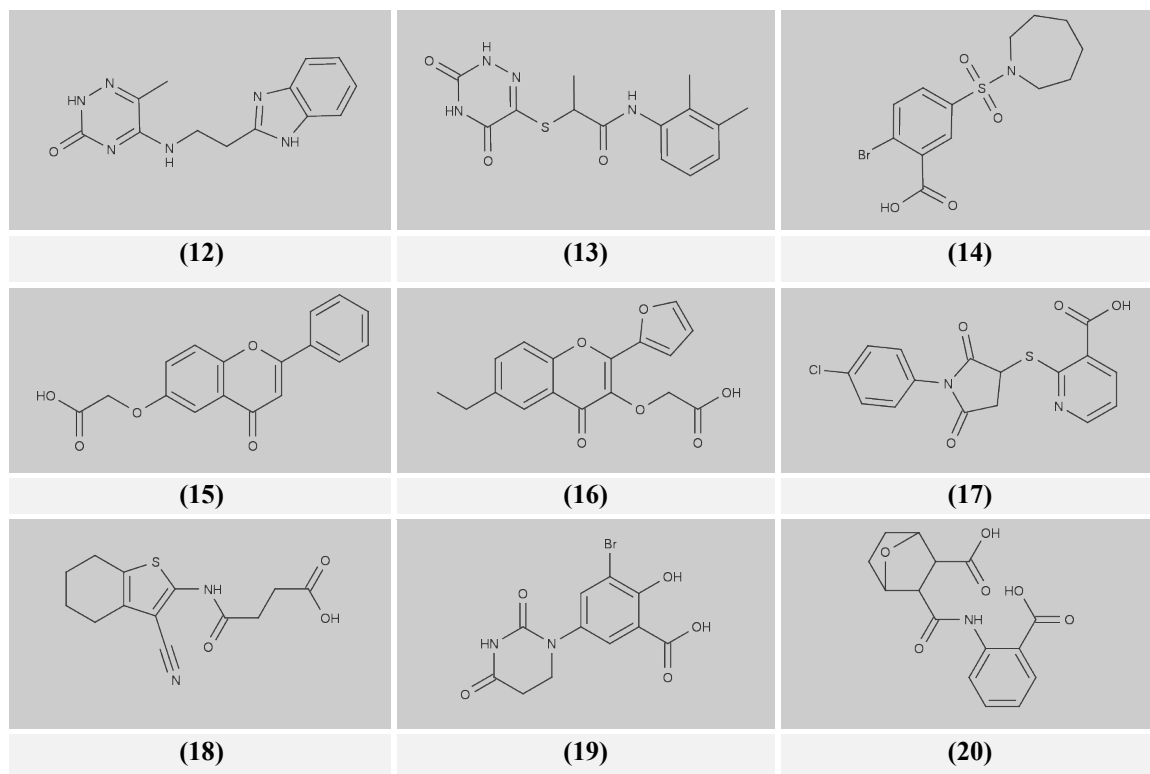
Analisando os valores da afinidade dos inibidores (K_i^{ap}) pela enzima, os inibidores competitivos foram os mais potentes se comparados com os outros quatro inibidores discutidos acima. Um dos compostos mais potentes (composto **1**, $K_i^{ap} = 45,11 \mu\text{M}$) encontrado neste trabalho pertence a este grupo. Além disso, analisando-se novamente as Tabelas 7.1 e 7.2 nota-se que os valores de K_i^{ap} para os compostos variam de 45,11 a 854,93 μM , com 4 compostos abaixo de 100 μM , quatro entre 100 e 200 μM e três acima de 300 μM .

7.6.3 – Compostos inativos

Nove compostos foram inativos contra a GAPDH (Tabela 7.3) na concentração do inibidor usada no ensaio (50 μM). A maioria desses compostos não alterou o curso normal da reação, ou seja, os valores de K_M , k_{cat} e V_{max} permaneceram inalterados na presença dos inibidores. O composto **15**, pertencente da classe dos flavonóides foi inativo, assim como o composto **16** que também apresenta uma estrutura muito semelhante à de um flavonóide (um furano está ocupando a posição do anel B dos

flavonóides). Esse resultado foi uma surpresa, já que esta classe de compostos tem se mostrado ativa contra a GAPDH de *T. cruzi*^[5,6,7].

Tabela 7.3 - Estrutura dos compostos inativos contra a GAPDH.



Analisando as interações dos compostos inativos com os aminoácidos do sítio ativo, observamos que sete das nove moléculas apresentam o grupo carboxila nas suas estruturas e formam interações eletrostáticas com o aminoácido Arg249, como por exemplo, o composto **19** (Figura 7.7). Como os experimentos foram realizados no pH 7,5, o grupo guanidina do aminoácido Arg249 se encontra carregado positivamente. Por outro lado, o grupo carboxila dos ligantes se encontra carregado negativamente (carboxilato) no pH 7,5. Dessa forma os grupos guanidina e carboxilato se atraem formando interações eletrostáticas. Apenas duas moléculas inativas (composto **12** e **13**) não apresentam o grupo carboxila nas suas estruturas. Mesmo assim, ambos formam ligações de hidrogênio com o grupo guanidina da Arg249.

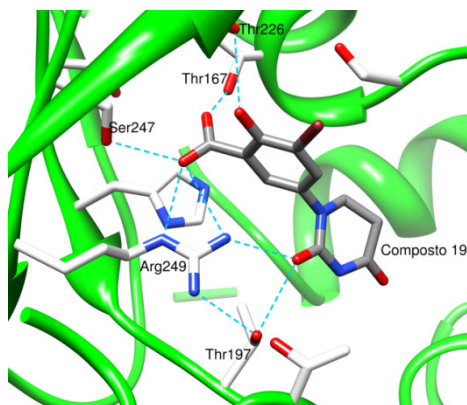


Figura 7.7 - Posição adotada pelo composto **19** no sítio ativo da GAPDH. Os resíduos com que fazem interações por ligação de hidrogênio e eletrostáticas estão nomeados. As interações são representadas por linhas azuis tracejadas.

Apesar de nove compostos terem sido inativos contra a enzima, os resultados de inibição enzimática obtidos com a técnica de ITC indicam que o planejamento computacional realizado na seleção dos compostos foi bem sucedido. Isso porque a taxa de acerto (número de moléculas ativas/número de moléculas testadas) obtida nesse trabalho foi de 55%. Se forem considerados apenas os compostos com $K_i^{ap} < 100 \mu\text{M}$ esse número cai para 20%. Mesmo assim, esse é um número considerável, já que vários trabalhos têm mostrado que a taxa de acerto gira em torno de 1-10% usando métodos computacionais de ensaio *in silico* e cerca de 0-2% para ensaios em larga escala (HTS)^[8-10].

7.6.4 – Impressões digitais das interações

A análise retrospectiva da posição e das interações dos compostos no sítio ativo, de acordo com o programa FlexX, foi realizada para tentar formular uma hipótese para explicar o motivo pelo qual alguns compostos foram ativos e outros inativos. Essa análise permitiu a identificação das *impressões digitais* das interações inibidor-GAPDH. Isto é, o tipo de interação e o resíduo envolvido na interação com o ligante foram determinados (Figura 7.8).

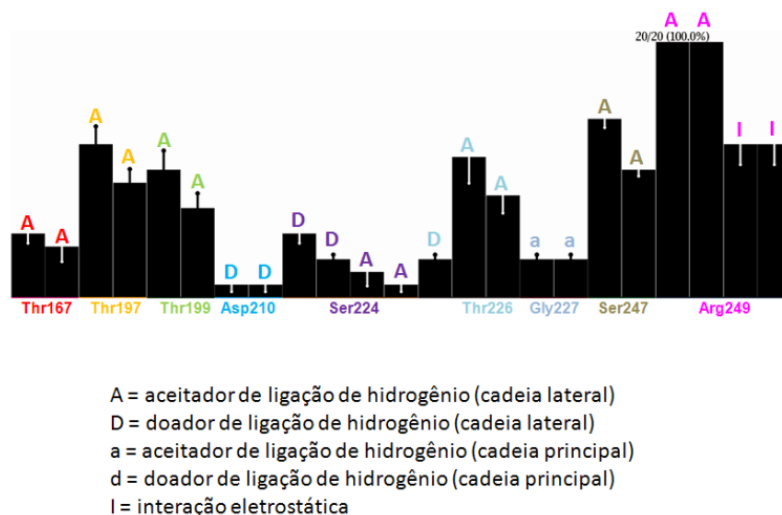


Figura 7. 8 - Análise das impressões digitais das interações ligante-enzima.

O histograma da Figura 7.8 reporta a frequência e as características das interações que os compostos fazem com os resíduos do sítio ativo da GAPDH. Podemos observar algumas tendências nesse gráfico. Primeiro, os resíduos que mais participam de interações com os ligantes são os resíduos Arg249, Ser247, Thr226, Ser224, Thr197 e Thr199. Em segundo lugar, observamos que os compostos se ligam no sítio da enzima principalmente através de ligações de hidrogênio entre um grupo aceitador de ligação de hidrogênio do composto e um grupo doador na cadeia lateral da enzima, que nos resíduos Thr e Ser correspondem a uma hidroxila. As interações eletrostáticas com a Arg249 também são responsáveis pela ligação de um número significativo de compostos. Por fim, podemos notar que todos os vinte compostos testados formam ligações de hidrogênio com a cadeia lateral (grupo guanidina) da Arg249.

Levando-se em consideração a afinidade dos compostos pelo alvo, foi possível avaliar quais interações contribuem para que um composto fosse ativo ou inativo. Nessa análise os compostos que inibiram a enzima foram classificados como ativos e os que não inibiram foram chamados de inativos. No histograma da Figura 7.9, as barras no sentido positivo indicam as interações que são importantes para que o composto fosse ativo. Já as barras no sentido negativo correspondem às interações presentes nos compostos inativos.



Figura 7.9 - Histograma da contribuição das interações para a atividade biológica dos compostos.

Como todos os compostos apresentam ligações de hidrogênio com a Arg249 (Figura7.8), essa interação não é relevante para saber se um composto que se ligue com esse resíduo através dessa interação, será ou não ativo. Essa observação é descrita graficamente na Figura 7.9, onde não há nenhuma barra correspondente à interação por ligação de hidrogênio com a Arg249. Enquanto isso, os compostos que apresentaram interações predominantes com os resíduos Thr167, Ser224, Thr226, Ser247 e Arg249 foram inativos. Ao passo que as interações com os resíduos Thr197 e Thr199 foram determinantes para que os compostos inibissem a enzima. Esse resultado é coerente, já que a Thr197 e Thr199 fazem parte do sítio de ligação do G3P (sítio P_s) enquanto que os resíduos Thr167, Ser224, Thr226 e Ser247 se localizam no sítio de ligação do fosfato inorgânico (sítio P_i). Em conjunto, esses resultados indicam que para um composto ser ativo contra a GAPDH é essencial que ele forme interações com os resíduos do sítio P_s.

7.6.5 – Eficiência do ligante

Com base apenas no exame do valor de K_i^{ap} poderia se chegar à conclusão precipitada de que apenas o composto **1** seria considerado um razoável inibidor da GAPDH. Contudo, é necessário avaliar um parâmetro fundamental e que tem o seu uso bastante difundido no planejamento de inibidores enzimáticos: a *eficiência do ligante*. Esse parâmetro pode ser usado para determinar a qualidade dos ligantes obtidos no ensaio inicial e também para monitorar a qualidade dos compostos-matrizes que estão sendo otimizados. Hopkins *et al.*^[11] definiu a eficiência do ligante simplesmente como:

$$LE = -\frac{\Delta G}{HAC} = -\frac{RT \ln K_d}{HAC} \approx \frac{-RT \ln IC_{50}}{HAC} \quad (4)$$

onde ΔG é a energia de interação do ligante por um alvo específico, HAC é o número de átomos diferentes de hidrogênio e a constante de dissociação (K_d) pode ser substituída pelo valor de IC_{50} como uma medida aproximada da afinidade do ligante pelo alvo. Para que um ligante ou composto-matriz seja útil ele deve apresentar uma eficiência do ligante aproximadamente igual a $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$. A Figura 7.10 ilustra o conceito de eficiência do ligante e como ele está relacionada com a “acessibilidade” química do ligante^[12]. Para se tornar um candidato a composto-matriz, a potência de um ligante precisa ser melhorada, o que quase sempre ocorre em paralelo com um aumento da massa molecular^[13]. Os ligantes oriundos da técnica de HTS apresentam uma extensa faixa de massas moleculares (250-600 Da) e geralmente exibem afinidades na faixa de baixo μM até alto nM ^[13]. Dificilmente a otimização, de um número significativo desses ligantes, irá produzir moléculas que se enquadrem no espaço químico definido pela *regra dos cinco* de Lipinski^[14], a qual serve como um guia qualitativo para prever se as moléculas apresentarão boa absorção e permeabilidade. Contudo, como os ligantes com características de *fragmentos moleculares*^[15,16] são menos complexos (menor massa molecular), são capazes de fazer interações mais específicas, podendo se ajustar com maior facilidade no sítio do alvo. Assim, na otimização desses compostos, não só a afinidade aumenta, mas também o perfil farmacocinético adequado é mantido^[14].



Figura 7. 10 - Evolução do ligante a composto-matriz partindo de diferentes espaços químicos.

O uso da eficiência do ligante tem ajudado a reduzir a sedutora influência do aumento da potência após cada iteração no desenvolvimento de um composto e serve para lembrar ao químico medicinal que a consideração das propriedades físico-químicas é igualmente importante^[17].

Vários trabalhos na literatura mostram que partindo-se de pequenas moléculas que apresentem uma eficiência do ligante próxima de $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$ (e até

mesmo menor) é possível realizar a sua otimização, que geralmente é feita através da união de dois ou mais compostos (linking) ou através do crescimento da molécula (growing). Na união de compostos que apresentam uma eficiência do ligante em torno de $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$ é observado um efeito sinérgico extraordinário e a molécula resultante pode apresentar uma potência que em alguns casos chega a ser superior a duas unidades logarítmicas com relação às estruturas de partida^[18,13].

Analisando a Tabela 7.4 constata-se que vários inibidores encontrados nesse trabalho apresentam uma massa molecular em torno de 300 Da e cerca de 23 átomos pesados. A eficiência do ligante desses compostos, principalmente daqueles que exibem um $K_i^{ap} < 200 \mu\text{M}$, está por volta de $0,24 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$. Com base nessa análise, podemos dizer que muitos desses compostos são atraentes do ponto de vista da otimização. Isso porque eles apresentam uma eficiência do ligante muito próxima do valor ideal e na otimização desses compostos poderíamos adicionar em média mais 14 átomos até que o composto atinja uma massa molecular de aproximadamente 500 Da. No Anexo são mostradas mais algumas propriedades, além da massa molecular, que mostram que os compostos ativos possuem “espaço” para crescerem sem prejudicar o seu perfil farmacocinético. Por exemplo, o coeficiente de partição (logP) dos inibidores é em média igual a 2,65, sendo que os fármacos que são administrados oralmente apresentam valores médios ≤ 5 .

Tabela 7.4 - Eficiência do ligante dos inibidores da GAPDH de *T. cruzi*.

Composto	MM ¹	HAC ²	K_i^{ap} (μM)	LE ³ ($\text{kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$)
1	361,35	25	$45,11 \pm 7,19$	0,24
2	315,35	22	$81,93 \pm 18,08$	0,25
3	326,39	23	$91,50 \pm 18,66$	0,24
4	411,29	23	$112,80 \pm 18,15$	0,23
5	276,33	19	$124,83 \pm 28,63$	0,28
6	336,82	22	$155,50 \pm 51,61$	0,24
7	354,14	23	$182,87 \pm 78,76$	0,22
8	321,72	22	$89,28 \pm 2,72$	0,25
9	292,35	20	$386,17 \pm 32,91$	0,23
10	312,34	22	$692,90 \pm 117,11$	0,20
11	354,14	23	$854,93 \pm 307,61$	0,18

¹Massa molecular; ²Número de átomos diferentes de hidrogênio; ³Eficiência do ligante.

7.7 – Referências

- [1] COPELAND, R. A. **Enzymes**: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. New York: Wiley-VCH, 2000. 397 p.
- [2] COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. New Jersey: Wiley-VCH, 2005. 296 p.
- [3] SYSTAT SOFTWARE. **Sigmaplot 10**. [Programa de Computador]. Richmond: [s.n], 2006. 1 CD-ROM.
- [4] American Chemical Society, **SciFinder Scholar**. [Programa de Computador]. Columbus: [s.n], 2007. 1 CD-ROM.
- [5] 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* **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 7, p. 740-742, 2005.
- [6] 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). **J. Braz. Chem.**, v. 14, n. 3, p. 380-387, 2003.
- [7] 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 magnífica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 643-651, 2000.
- [8] SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
- [9] SHOICHET, B.; K.; MCGOVERN, S.; L.; WEI, B.; IRWIN, J. Lead discovery using molecular docking. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, n. 4, p. 439-446, 2002.
- [10] RESTER, U. Dock around the clock – current status of small molecule docking and scoring. **QSAR Comb. Sci.**, v. 25, n. 7, p. 605-615, 2006.
- [11] HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discov. Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.
- [12] SIEGAL, G.; AB, E. Integration of fragment screening and library design. **Drug Discov. Today**, v. 12, n. 23, p. 1032-1039, 2007.

[13] CARR, R. A. E.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; REES, D. C. Fragment-based lead discovery: leads by design. **Drug Discov. Today**, v. 10, n. 14, p. 987-992, 2005.

[14] 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. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 3-25, 1997.

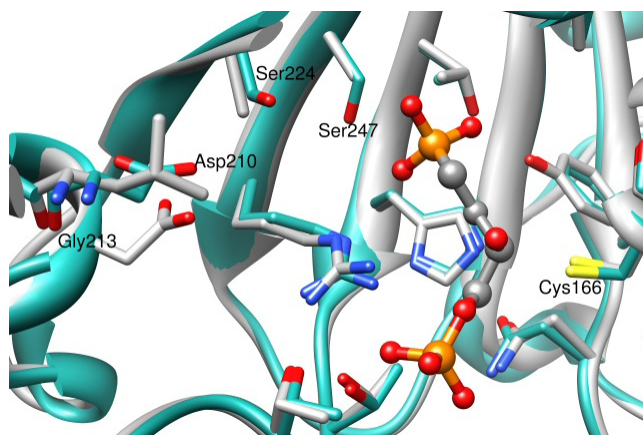
[15] LEACH, A. R.; HANN, M. M.; BURROWS, J. N.; GRIFFEN, E. J. Fragment screening: an introduction. **Mol. Biosyst.**, v. 2, n. 9, p. 429-426, 2006.

[16] REES, D. C.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; CARR, R. Fragment-based lead discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 8, p. 660-672, 2004.

[17] CONGREVE, M.; CHESSARI, G.; TISI, D.; WOODHEAD, A. J. Recent Developments in Fragment-Based Drug Discovery. **J. Med. Chem.**, v. 51, n. 13, p. 3661-3680, 2008.

[18] HADJUK, P.; GREER, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 3, p. 211-219, 2007.

CAPÍTULO 8



*Estudos de seletividade enzimática e in vitro contra o *T. cruzi**

A seletividade dos inibidores da GAPDH de *T. cruzi* foi avaliada usando a enzima de coelho como modelo e os resultados desses estudos são apresentados neste capítulo. Além disso, a capacidade dos novos compostos em inibir as formas infectivas do parasito também foi verificada e discutida neste capítulo.

8 – SELETIVIDADE

Um aspecto essencial na busca por inibidores enzimáticos de agentes causadores de doenças e que apresentam enzimas homólogas no homem é a *seletividade*. A afinidade pela enzima alvo é apenas um critério usado para julgar a qualidade de um inibidor. De igual importância é a seletividade do composto pela enzima alvo em relação a enzimas estruturalmente ou mecanisticamente relacionadas e presentes no homem^[1]. Esta foi uma preocupação que tivemos desde a seleção dos compostos. Como desejávamos encontrar moléculas que não somente inibissem a GAPDH de *T. cruzi*, mas também que apresentassem seletividade em relação à GAPDH de humanos realizamos uma docagem consensual, a qual permitiu priorizar a seleção de moléculas que apresentassem ao mesmo tempo uma alta complementaridade pela GAPDH do *T. cruzi* e uma baixa complementaridade frente a GAPDH de humanos.

Para avaliar se os compostos selecionados são capazes de inibir a enzima GAPDH de humanos, selecionamos os seis melhores inibidores da GAPDH do *T. cruzi*. Estes inibidores foram então testados contra a GAPDH de coelho, que é um ótimo modelo para enzima de humanos, já a que identidade entre estas duas enzimas é maior do que 90%.

8.1 – Materiais

Os reagentes D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P), trietanolamina (TEA), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), β -mercaptoetanol, arseniato de sódio ($\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+), dimetilsulfóxido (DMSO) e a enzima GAPDH de coelho foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

8.2 – Procedimento Experimental

8.2.1 – Determinação da entalpia molar aparente da reação catalisada pela enzima GAPDH de coelho

Para se determinar a entalpia da reação de conversão do G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato, a entalpia molar aparente dessa reação foi determinada no tampão TEA-HCl. O experimento foi realizado preenchendo-se a cela de amostra com o tampão (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 GAPDH 2 μM preparada no mesmo tampão. 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-DPG) inibe a enzima.

O substrato foi titulado pela injeção de 20 μL de enzima durante 40 segundos. Após a injeção a concentração final da enzima na cela era de 28 nM. Uma segunda injeção de enzima foi feita após a linha base retornar ao valor anterior ao da primeira injeção para comprovar o completo consumo do G3P na reação.

8.2.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima GAPDH de coelho

Os parâmetros cinéticos do G3P (K_M , V_{max} e k_{cat}) foram determinados de acordo com o protocolo previamente estabelecido em nosso laboratório^[2]. A seringa foi preenchida com D,L-G3P 5 mM, tampão TEA-HCl 100 mM (pH 7,5) e DMSO 5%. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO_4 30 mM, NAD^+ 1,5

mM, DMSO 5% e a enzima GAPDH 5 nM. O substrato foi titulado sobre a enzima através de 15 injeções de 4 µL, com intervalos entre elas de 60 segundos.

8.2.3 – Estudos da inibição enzimática da GAPDH de *T. cruzi* e de coelho

A avaliação dos compostos selecionados como possíveis inibidores da enzima GAPDH de coelho foi realizada preenchendo-se a seringa com D,L-G3P 5 mM no tampão TEA-HCl (100 mM; pH 7,5) e 5% de DMSO. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO₄ 30 mM, NAD⁺ 1,5 mM, 5% de DMSO e a enzima GAPDH 5 nM. Os compostos foram adicionados à cela de amostra numa concentração final de 50 µM. Em seguida, titulou-se a enzima através de 15 injeções do substrato, sendo que o volume de cada injeção foi de 2,5 µL, com intervalos entre elas de 60 segundos. Um experimento controle (na ausência do inibidor) foi realizado antes de cada ensaio de inibição seguindo o mesmo protocolo.

8.2.4 – Estudos *in vitro* contra as formas tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*

Os onze inibidores da GAPDH de *T. cruzi* foram enviados para o Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP) coordenado pelo professor Sérgio de Albuquerque. Os inibidores foram avaliados primeiramente contra a forma tripomastigota do parasito. A potência (IC₅₀) dos compostos foi determinada a partir da % de lise (% de inibição) em quatro concentrações diferentes (0,5, 2, 8 e 32 µM). Os compostos que inibiram a forma tripomastigota foram testados contra a forma amastigota nas mesmas concentrações.

8.2.5 – Análise dos dados

Todos os experimentos realizados nesse trabalho foram realizados ao menos em duplicata. Os dados referentes à concentração do substrato, [S], e a velocidade da reação, v, foram obtidos usando-se o programa Origin 7.0^[3]. As constantes K_M , k_{cat} e V_{max} foram determinadas através da regressão não-linear dos dados experimentais na equação de Michaelis-Menten (Capítulo 6, Equação 5) usando o programa SigmaPlot 10.0.1^[4]. A constante de inibição aparente (K_i^{ap}) dos compostos testados foi obtida

através da regressão não linear dos dados experimentais às equações para inibidores competitivos, não-competitivos e incompetivos (Capítulo 7, Equações 1, 2 e 3, respectivamente) usando-se o módulo de cinética enzimática do programa SigmaPlot^[4]. A decisão sobre qual mecanismo é mais apropriado para cada composto foi feita com base na análise dos parâmetros estatísticos dos modelos e na forma das curvas obtidas experimentalmente.

8.3 – Resultados e Discussões

8.3.1 – Determinação da entalpia da reação de conversão G3P a 1-arseno-3-fosfoglicerato

A entalpia aparente da reação foi determinada colocando-se a enzima na seringa numa concentração suficiente (2 μM) para que através de uma única injeção, todo o substrato (1 mM) presente na cela de amostra fosse convertido em produto (Figura 8.1). Após a estabilização da linha base a enzima foi injetada na solução e observou-se uma deflexão da linha base até o seu retorno ao valor inicial. A deflexão verificada após a injeção da enzima na solução evidencia que a reação catalisada pela GAPDH é exotérmica. Analisando-se a Figura 8.1, observa-se que o tempo médio necessário para que todo o substrato presente na cela de amostra fosse convertido em produto girou em torno 15-20 minutos

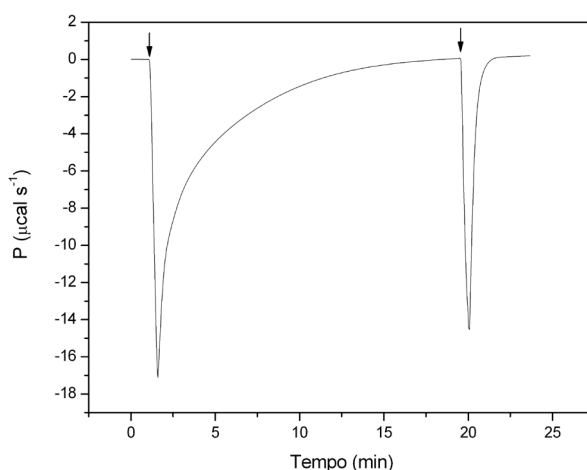


Figura 8.1 - Determinação da entalpia aparente da reação. As setas indicam o início das injeções.

Uma segunda injeção de enzima foi realizada com o objetivo de verificar se a primeira injeção foi suficiente para consumir todo o substrato. Como pode ser verificada na Figura 8.1 e também na Tabela 8.1, a área correspondente à segunda injeção é bem inferior à primeira.

Tabela 8.1 - Resultados obtidos na determinação da entalpia aparente da reação.

Experimento	Q (x 10^{-6} kcal)		$\Delta H_{app, molar}$ (kcal mol $^{-1}$)
	Q_r	Q_d	
1	-2,72	-0,53	-6,46 ± 0,28
2	-2,85	-0,52	
Média	-2,79 ± 0,09	-0,52 ± 0,01	

O número de moles de G3P na cela de amostra era de 0,35 μ mol.

O valor da entalpia molar aparente, calculado usando-se a Equação 1, foi de $-6,46 \pm 0,28$ kcal mol $^{-1}$. Os valores de calor de reação (Q_r) e de diluição (Q_d) corresponde a área do pico obtida na primeira e segunda injeções, respectivamente. Como o experimento foi realizado a pressão constante, com variações de volume desprezíveis, é possível considerar o calor gerado na reação como sendo igual à entalpia.

$$\Delta H_{app, molar} = \frac{Q_r - Q_d}{n} \quad (1)$$

8.3.2 – Determinação dos parâmetros cinéticos para o gliceraldeído-3-fosfato (G3P)

Na Figura 8.2 observa-se um ensaio calorimétrico completo da enzima GAPDH no tampão TEA-HCl. Após a estabilização da linha base, observa-se uma inflexão desta até a sua nova estabilização em um nível inferior. Esse decréscimo da potência térmica fornecida pelo instrumento indica que a reação de conversão do substrato em produto é exotérmica. Esse processo é repetido nas próximas injeções, até que a enzima fique totalmente saturada com o substrato (em torno da 11^a injeção).

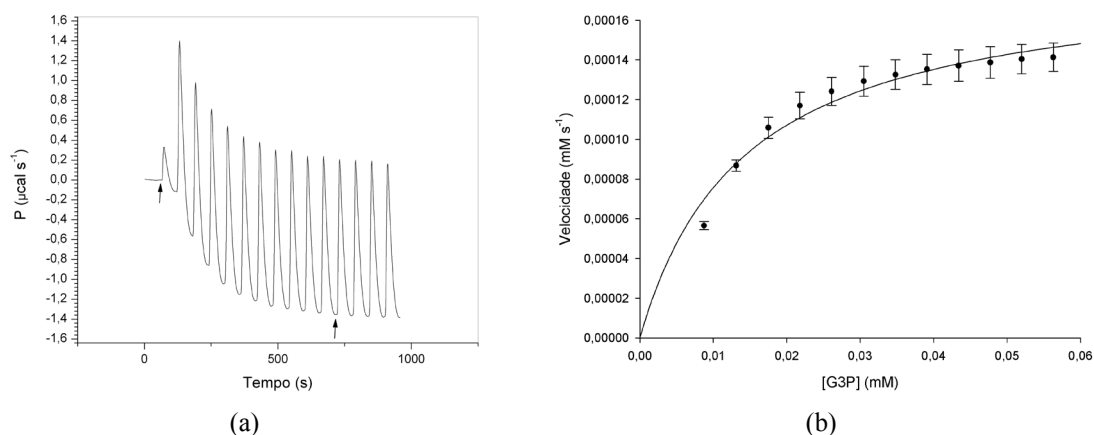


Figura 8.2 - (a) Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH. As setas indicam o início da 1ª e da 11ª injeção; (b) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten ($R^2 = 0,89$).

Medindo-se a diferença entre a linha base original e a nova linha base após a adição do substrato (Figura 8.2a), obtém-se o valor da potência térmica gerada para cada injeção. Com isso, após várias injeções do substrato, a curva completa de Michaelis-Menten da reação foi obtida (Figura 8.2b). A velocidade da reação foi corrigida pelo valor de $\Delta H_{\text{app,molar}}$ calculado anteriormente. O ponto relativo à primeira injeção foi excluído devido a dificuldade em obter valores reprodutíveis. Os dados foram ajustados à curva de Michaelis-Menten pela regressão não linear dos mínimos quadrados usando o programa SigmaPlot (Figura 8.2b). Uma série de três experimentos foi realizada para se obter as constantes cinéticas. A partir destes experimentos, os valores de K_M , k_{cat} e V_{max} foram determinados (Tabela 8.2).

Tabela 8.2 - Constantes cinéticas calculadas para o G3P, na presença de 5% de DMSO..

Parâmetros	Valor	Intervalo de confiança de 95%
V_{max} ($\times 10^{-3} \text{ mM s}^{-1}$)	$1,83 \pm 0,08$	1,65 a 2,01
K_M (μM)	$14,20 \pm 2,12$	9,81 a 18,61
k_{cat} (s^{-1})	$36,65 \pm 1,73$	33,07 a 40,22
k_{cat}/K_M ($\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	2,58	
$R^2 = 0,89$		

Comparando-se o valor da constante de Michaelis-Menten (K_M) para o G3P na reação catalisada pela GAPDH de coelho, observa-se que esta constante é menor ($14,20 \mu\text{M}$) do que a observada para a GAPDH de *T. cruzi* ($37,80 \mu\text{M}$). Considerando que o K_M pode ser considerado uma medida aproximada da afinidade da enzima pelo

substrato, esses resultados sugerem que a afinidade da enzima de coelho pelo G3P é maior do que a enzima do parasito. Dessa forma, um composto só irá conseguir inibir a enzima de coelho na mesma proporção da enzima do *T. cruzi* se sua constante de afinidade (K_i^{ap}) for menor na GAPDH de coelho.

8.3.3 – Estudos de inibição enzimática e de seletividade

Como a maioria dos compostos apresentava uma baixa solubilidade em água, optou-se por preparar soluções estoque desses compostos dissolvendo-os em DMSO puro. Além disso, a concentração de todos os compostos na cela, que foi mantida fixa em 50 μM . A enzima perde atividade com o passar do tempo (há uma diminuição no valor do k_{cat}), apesar do valor de K_M se manter constante de um experimento para outro. A forma encontrada para contornar esse problema foi realizar um experimento controle (na ausência do inibidor) sempre antes do ensaio de inibição (na presença do inibidor).

Para avaliar a seletividade dos inibidores da GAPDH de *T. cruzi* frente à enzima de coelho, que é um excelente modelo para a GAPDH de humanos, selecionamos os compostos que apresentaram um K_i^{ap} menor que 150 μM . Com esse critério de seleção, seis compostos, dos onze que se mostraram previamente como sendo inibidores da GAPDH do parasito, foram testados contra a GAPDH de coelho. Os resultados dos ensaios de inibição para os compostos estão dispostos na Tabela 8.3. A numeração dos compostos segue a mesma ordem adotada anteriormente para facilitar as comparações.

Tabela 8.3 - Valores para o K_M , k_{cat} , V_{max} , K_i^{ap} e dos inibidores avaliados contra a GAPDH de coelho.

Composto	K_M (μM)	V_{max} ($\times 10^{-4}$ mM s^{-1})	K_i^{ap} (μM)	Mecanismo
1	16,38 \pm 0,23 (14,21 \pm 0,21)	1,84 \pm 0,09 (1,83 \pm 0,08)	386,96 \pm 210,00	competitivo
2	19,39 \pm 0,24 (17,28 \pm 0,22)	1,25 \pm 0,06 (1,24 \pm 0,05)	473,92 \pm 249,72	competitivo
3	24,52 \pm 0,54 (19,91 \pm 0,31)	1,18 \pm 0,11 (1,14 \pm 0,07)	391,77 \pm 237,81	competitivo
4	7,01 \pm 0,75 (11,55 \pm 0,11)	0,95 \pm 0,02 (1,15 \pm 0,03)	420,73 \pm 71,81	incompetitivo
5	10,51 \pm 0,09 (12,56 \pm 0,12)	1,20 \pm 0,03 (1,25 \pm 0,03)	ni**	-
8	18,94 \pm 0,23 (21,10 \pm 0,20)	1,46 \pm 0,07 (1,55 \pm 0,05)	1206,46 \pm 743,16	incompetitivo

* Os valores em parênteses foram obtidos na ausência do inibidor.**ni = não inibiu.

Conforme é possível observar na Tabela 8.3, somente cinco compostos inibiram a GAPDH de coelho, sendo três competitivos (compostos **1-3**) e dois incompetitivos (compostos **4** e **8**). Para um dos compostos avaliados (composto **5**), não foi possível ajustar os seus dados a nenhum dos modelos de inibição enzimática, já que seus parâmetros tanto na ausência quanto na presença do inibidor são os mesmos, indicando que este composto não é capaz de inibir a GAPDH de coelho.

Em termos dos valores de K_i^{ap} , os cinco compostos podem ser considerados como inibidores fracos da GAPDH de coelho, já que a constante de inibição varia de 386,96 μM a 1206,46 μM . O melhor inibidor da enzima de coelho (composto **1**, $K_i^{ap} = 386,96 \mu\text{M}$) é cerca de três vezes menos ativo nesta enzima do que o pior inibidor da enzima do parasito (composto **5**, $K_i^{ap} = 124,83 \mu\text{M}$) selecionado para os estudos de seletividade. Esses resultados estão de acordo com as nossas expectativas, já que na etapa de planejamento computacional, priorizamos a seleção de compostos com alta afinidade pela enzima do parasito e baixa pela enzima de humanos.

A seletividade, juntamente com a afinidade pelo alvo são dois parâmetros essenciais que devem ser determinados durante o processo de busca por moléculas bioativas. Ela está relacionada às diferenças observadas na afinidade da molécula por alvos estruturalmente e mecanisticamente homólogos do alvo de interesse. A baixa seletividade de uma molécula é responsável pelo aparecimento de efeitos tóxicos no homem. Como exemplo, podemos citar os inibidores da enzima transcriptase reversa do vírus HIV-1 (HIV-RT) de 1ª geração. Estes eram análogos de nucleosídeos e inibiam a HIV-RT de forma competitiva. A maior deficiência desses inibidores era a falta de seletividade para a enzima viral frente às enzimas de humanos que utilizavam nucleosídeos como substratos^[1]. Com isso, esses fármacos provocavam fortes reações adversas nos portadores do vírus HIV-1.

A enzima GAPDH de *T. cruzi*, que é o alvo do presente trabalho, também está presente no homem, e realiza a mesma função em ambos os organismos. As estruturas das duas enzimas também são muito próximas. Por exemplo, o grau de similaridade entre estas enzimas é de 66,3%. Se considerarmos a região do sítio ativo, esse valor sobe para 80,8%^[5]. Já a similaridade entre a GAPDH de coelho e a de *T. cruzi* é de 67,3% e na região do sítio ativo essa similaridade aumenta para 77,7%^[5]. Esses dados indicam que a tarefa de encontrar inibidores seletivos pela enzima do parasito não é trivial.

A partir dos resultados da inibição da GAPDH de coelho, foi possível avaliar a seletividade dos nossos compostos pela enzima de *T. cruzi* frente à enzima do coelho. Na Tabela 8.4 é possível observar que enquanto o valor da constante de inibição para enzima de *T. cruzi* varia de 45,11 μM a 124,83 μM , na enzima de coelho ela varia de 386,96 μM a 1206,46 μM . Isso indica que apesar da elevada similaridade entre as enzimas, o nosso planejamento computacional foi eficiente em selecionar compostos que apresentam uma afinidade maior pela enzima do parasito do que pela enzima de coelho; o que implica em dizer que os nossos compostos são seletivos pela enzima do parasito em relação à de coelho (Tabela 8.4). A seletividade dos nossos melhores inibidores varia de 4-14 vezes. Apesar da seletividade nesse primeiro momento não ser muito elevada, ela até superou as nossas expectativas, já que estes compostos são considerados apenas ligantes e ainda não foram submetidos a nenhuma otimização estrutural. Além disso, o composto **5**, que inibe a enzima do parasito com um K_i igual a 124,83 μM não inibiu a enzima de coelho.

Tabela 8.4 - Seletividade dos inibidores da GAPDH de *T. cruzi* frente à enzima de coelho.

Composto	MM ¹	K_i^{ap} (μM) - <i>T. cruzi</i>	K_i^{ap} (μM) - Coelho	Seletividade
1	361,35	45,11 \pm 7,19	386,96 \pm 210,00	9
2	315,35	81,93 \pm 18,08	473,92 \pm 249,72	6
3	326,39	91,50 \pm 18,66	391,77 \pm 237,81	4
4	411,29	112,80 \pm 18,15	420,73 \pm 71,81	4
5	276,33	124,83 \pm 28,63	ni ²	-
8	321,72	89,28 \pm 2,72	1206,46 \pm 743,16	14

¹Massa molecular; ²Não inibiu.

8.3.4 – Estudos de inibição das formas tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*

Os onze inibidores da GAPDH de *T. cruzi*, previamente encontrados nesse trabalho foram avaliados através de ensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota do parasito. Esses estudos foram feitos em colaboração com o professor Sérgio de Albuquerque (FCFRP-USP). Os compostos foram testados nas concentrações de 0,5, 2, 8 e 32 μM e os valores de IC₅₀ (concentração necessária de um composto para que haja 50% de inibição *in vitro*) foram calculados a partir da porcentagem de lise parasitária (% de lise) obtidos nessas concentrações (Tabela 8.5).

Tabela 8.5 - Atividade tripanocida dos inibidores da GAPDH de *T. cruzi* contra as formas infectivas tripomastigota e amastigota.

Composto	Concentração (μM) x % de Lise (\pm SD)				IC ₅₀ (μM)
	0,5	2,0	8,0	32,0	
1	13,8 \pm 0,5	25,0 \pm 0,9	25,5 \pm 4,2	29,3 \pm 0,7	> 1000
2	0,0	4,8 \pm 0,9	7,6 \pm 0,6	8,9 \pm 0,7	> 1000
3	0,4 \pm 0,14	3,5 \pm 0,07	5,5 \pm 0,3	32,7 \pm 5,5	53,4
4	7,7 \pm 1,7	19,2 \pm 2,2	23,7 \pm 5,5	28,9 \pm 4,1	535,1
5	10,1 \pm 0,6	12,0 \pm 0,6	11,7 \pm 0,5	17,6 \pm 3,2	> 1000
6	0,0	4,2 \pm 0,3	7,9 \pm 0,7	14,4 \pm 0,9	743,0
7	3,6 \pm 1,1	10,8 \pm 1,0	14,4 \pm 1,0	21,9 \pm 4,0	867,0
8	11,7 \pm 1,2	15,3 \pm 1,4	16,5 \pm 2,5	39,5 \pm 3,8	109,7
9	0,0	5,0 \pm 0,9	7,9 \pm 0,6	8,9 \pm 0,7	> 1000
10	0,0	7,5 \pm 1,7	11,1 \pm 0,9	12,4 \pm 1,9	> 1000
11	11,7 \pm 1,2	12,4 \pm 0,7	14,2 \pm 0,8	14,2 \pm 1,6	> 1000
<i>Forma amastigota</i>					
3	0,0	0,0	43,9 \pm 6,6	83,9 \pm 4,1	10,02

Os resultados da Tabela 8.5 mostram que dentre os inibidores testados contra a enzima GAPDH, os mais potentes contra a forma tripomastigota são os compostos **3** e **8** que apresentam valores de IC₅₀ de 53,4 e 109,7 μM , respectivamente. Outros três inibidores foram ativos contra a forma tripomastigota com valores de IC₅₀ na ordem de alto micromolar.

Em consequência do excelente resultado apresentado pelo composto **3** em inibir a forma tripomastigota do *T. cruzi*, este composto foi avaliado também contra a forma amastigota do parasito. A inibição foi ainda mais significativa, em que o valor de IC₅₀ foi igual a 10,02 μM . Esses dados indicam que este composto apresenta uma elevada ação tripanocida contra as duas formas infectivas do parasito no homem e é um bom candidato para passar para a fase de otimização.

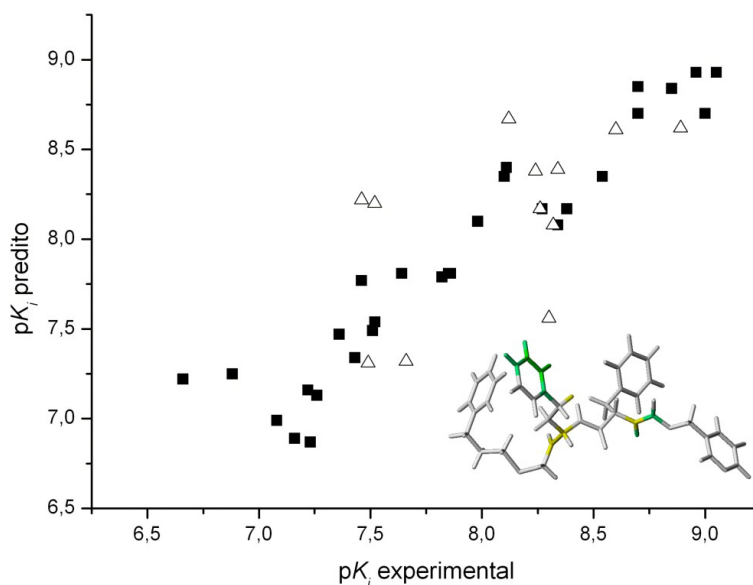
Da mesma forma que a seletividade pelo alvo enzimático de interesse é essencial para um candidato a fármaco, também, a seletividade destes pelas células do parasito é imprescindível para que haja o mínimo possível de efeitos tóxicos no homem. Em vista disso, foi realizado um estudo de citotoxicidade em células da linhagem LLCMK2 para o inibidor mais potente das formas tripomastigota e amastigota (composto **3**). Os resultados desse ensaio mostraram que o IC₅₀ desse composto foi de 1294 μM . Com isso, foi possível calcular o índice de segurança [IC₅₀ (LLCMK2)/ IC₅₀ (tripomastigota)]

do composto **3** como sendo igual a 24,2. Já em relação à forma amastigota, a seletividade é muito mais pronunciada, sendo igual a 129. Esses resultados indicam que o composto **3**, além de apresentar uma elevada ação tripanocida, também exibe uma baixa citotoxicidade em células LLCMK2, como revelado por seu elevado índice de segurança. Esses resultados em conjunto, qualificam o composto **3** a passar para a fase de otimização.

8.4 – Referências

- [1] COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. New Jersey: Wiley-VCH, 2005. 296 p.
- [2] 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. **Anal. Biochem.**, v. 37, p. 107-114, 2007.
- [3] EDWARDS, P. M. Origin 7.0: Scientific Graphing and Data Analysis Software. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 42, p. 1270–1271, 2002.
- [4] SYSTAT SOFTWARE. **Signaplot 10**. [Programa de Computador]. Richmond: [s.n], 2006, 1 CD-ROM.
- [5] EUROPEAN Bioinformatics Institute. **EMBOSS Pairwise Alignment Algorithm**. [Programa de Computador]. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>>. Acesso em: 15 out. 2009.

CAPÍTULO 9



Relações quantitativas estrutura-atividade

Uma sucinta introdução sobre a importância dos estudos de QSAR e do método HQSAR é abordada neste capítulo. Em seguida, são apresentados os resultados obtidos a partir dos estudos de HQSAR com duas classes de inibidores da enzima GAPDH de *T. cruzi*.

9 – RELAÇÕES QUANTITATIVAS ENTRE A ESTRUTURA-ATIVIDADE (QSAR)

As relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR) desempenham um importante papel na otimização de um ligante a composto-matriz^[1,2]. Os métodos de QSAR são empregados para capturar as relações entre as características estruturais dos compostos e suas respostas biológicas^[3]. Essa estratégia, busca identificar e quantificar as propriedades físico-químicas e estruturais (*descritores*) de um composto e avaliar se alguma(s) dessas propriedades está correlacionada com a resposta biológica daquele composto. Caso haja uma correlação, o químico medicinal pode usá-la para prever qual seria a resposta biológica de um análogo, sem antes tê-lo sintetizado. Existem duas vantagens em se usar os métodos de QSAR^[4]. Primeiro, os esforços na síntese de análogos seria focado naqueles que teriam uma melhor resposta biológica, o que diminuiria o número de compostos que precisariam ser sintetizados. Segundo, se a atividade do análogo não corresponde à calculada pelo modelo, alguma característica importante não foi considerada e o modelo precisa ser aperfeiçoado.

O processo de desenvolvimento de um modelo QSAR é tipicamente dividido em três partes: preparação dos dados, análise dos dados e validação do modelo^[5]. O primeiro estágio inclui a seleção do conjunto de dados para os estudos de QSAR e do cálculo dos descritores moleculares. A preparação dos dados envolve a separação dos dados em um *conjunto treinamento* e *teste*. O primeiro é usado para construir o modelo e o segundo é usado para validar o modelo. O segundo estágio envolve a seleção do método estatístico para a análise dos dados, que pode ser linear ou não linear como o método dos mínimos quadrados parciais (PLS)⁶. Finalmente, a terceira etapa corresponde à validação do modelo de QSAR desenvolvido. Nessa etapa, o poder preditivo do modelo é testado em uma coleção de compostos que não foram usados na construção do modelo (*conjunto teste, que neste caso é mais bem nomeado como conjunto de avaliação*). Recentemente, outra estratégia que tem sido bastante usada é a validação adicional do modelo usando um *conjunto externo*, que se baseia na predição da resposta biológica de uma coleção de compostos de outro artigo, laboratório, etc.

9.1 – Holograma QSAR

O método conhecido como *holograma QSAR* (HQSAR) é usado para encontrar a relação entre a estrutura molecular e a resposta biológica para uma série de compostos usando *hologramas moleculares* construídos a partir da contagem do número de fragmentos moleculares, que codificam a estrutura da molécula em descritores bidimensionais

No método de HQSAR, cada molécula do conjunto de dados é dividida em fragmentos estruturais que são identificados e colocados nos blocos (*bins*) de um vetor (*array*) com comprimento fixo para formar o holograma molecular^[7] (Figura 9.1a). Os blocos do holograma molecular são ocupados pelos descritores estruturais (variáveis independentes) que codificam toda a informação sobre a molécula. A equação da regressão não linear que correlaciona a informação da variação estrutural (codificada no holograma) com a variação na resposta biológica é obtida usando o método de regressão não linear PLS. Ao contrário de outros métodos baseados em fragmentos, o método de HQSAR considera e codifica todos os possíveis fragmentos (linear, ramificado, sobrepostos, etc.) no holograma. Opcionalmente, informações acerca das propriedades tridimensionais, como a hibridização e a quiralidade também podem ser consideradas na construção do holograma.

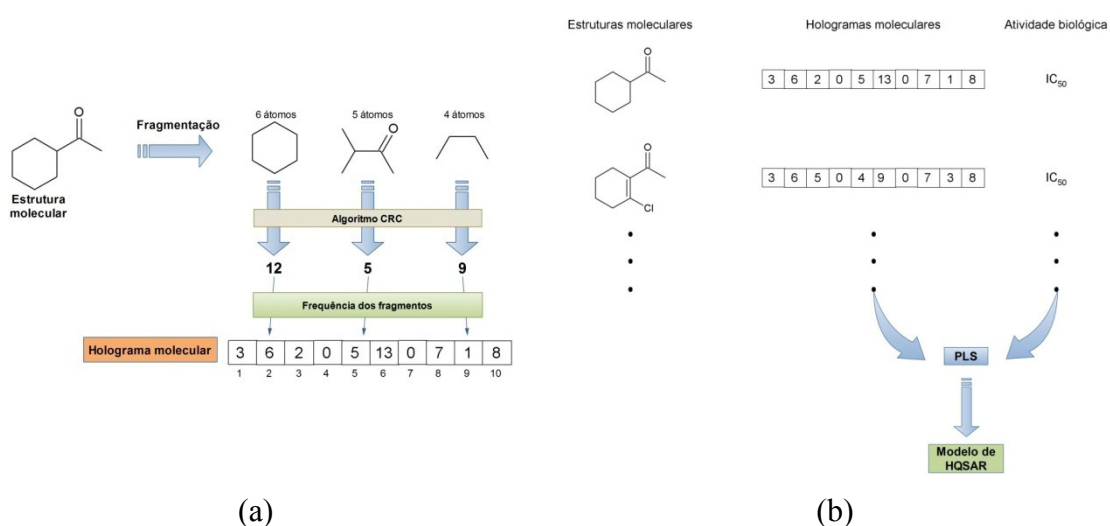


Figura 9.1 - (a) Construção do holograma molecular; (b) Desenvolvimento do modelo HQSAR.

Na construção dos modelos de HQSAR vários parâmetros podem afetar a sua qualidade: (i) comprimento do holograma, (ii) tamanho dos fragmentos e (iii) distinção

dos fragmentos^[8,9]. O comprimento do holograma define o número de posições no holograma disponíveis para que os diferentes fragmentos sejam codificados. O tamanho dos fragmentos é definido pelos números máximo e mínimo de átomos que são impostos aos fragmentos a serem gerados. Finalmente, a distinção dos fragmentos define as características estruturais que distinguem um fragmento do outro. Esses parâmetros são ajustados pelo usuário e determinam quais as características devem ser usadas na determinação da identidade única de cada fragmento: (i) átomos (A), (ii) ligação (B), (iii) conectividade (C), (iv) hidrogênio (H), (v) quiralidade (Ch) e (vi) doador/aceitador (D)^[9].

9.2 – Procedimento

9.2.1 – Coleção de compostos

Selecionamos dois compostos (**3** e **8**) previamente identificados como inibidores da GAPDH de *T. cruzi* e que também foram os capazes de inibir a forma tripomastigota do parasito para a realização dos estudos de QSAR. Para realizar o estudo de HQSAR com o composto **3**, foram adquiridos mais 16 compostos disponíveis comercialmente, totalizando uma coleção de 17 compostos. Já para o composto **8**, mais 10 compostos análogos foram comprados, sendo que a coleção final compreende 11 compostos.

Todos os compostos foram testados contra a GAPDH de *T. cruzi* que começamos a expressar em nosso laboratório. Em estudos realizados com essa enzima, observamos que ela mantém uma maior estabilidade por um período maior (até três semanas à 4°C) quando dialisada e armazenada no tampão HEPES. Com isso, todos os ensaios foram realizados usando a nova expressão/purificação da enzima nesse tampão. Os ensaios de inibição enzimática foram realizados usando a técnica de ITC seguindo o mesmo protocolo adotado anteriormente e discutido no capítulo 7. As constantes de inibição aparente (K_i^{ap}) foram convertidas para valores de pK_i^{ap} ($-\log K_i^{ap}$) e usadas como variáveis dependentes nas análises de HQSAR.

9.2.2 – Análise HQSAR

As análises de HQSAR foram realizadas avaliando-se todos os comprimentos do holograma disponíveis (doze no total), que variam de 51 até 401 blocos. Várias combinações entre o comprimento do holograma, tamanho dos fragmentos e distinção dos fragmentos foram usadas na construção dos modelos. Todos os cálculos foram realizados usando o método HQSAR implementado no pacote de modelagem molecular SYBYL7.3.

9.2.3 – Análise estatística

Todos os modelos foram produzidos usando a análise de PLS. O número ótimo de componentes principais (PCs) correspondendo ao menor erro padrão da predição (SEP) foram determinados usando o procedimento de validação cruzada chamado *deixe um de fora* (*leave-one-out*, LOO). Neste procedimento, cada composto é sistematicamente excluído uma vez do conjunto, e em seguida a resposta biológica é predita com o restante dos compostos. Com as atividades preditas dos compostos “de fora” é possível obter o valor coeficiente de correção da validação cruzada (Q^2).

9.3 – Resultados e Discussões

9.3.1 – Composto 3

Dos 17 compostos testados, quatro foram inativos. Com isso, o modelo de HQSAR foi construído dividindo-se os compostos ativos em conjunto treinamento (70%; **21-29**) e conjunto teste (30%; **3, 30-32**) (Tabela 9.1). O programa Surfex-Sim^[10] foi usado para selecionar os compostos do conjunto treinamento e teste. Num trabalho publicado em nosso grupo, esse programa mostrou ser a melhor opção para selecionar o mais ortogonal e diverso conjunto treinamento e teste^[11].

Tabela 9.1 - Valores de K_i^{ap} (μM) e $\text{p}K_i^{ap}$ para os compostos do conjunto treinamento e teste.

Composto	K_i^{ap} (μM)	$\text{p}K_i^{ap}$
<i>Conjunto treinamento</i>		
21	46,88 ± 4,83	4,33
22	72,89 ± 17,16	4,14
23	87,71 ± 19,37	4,06
24	103,30 ± 38,00	3,99
25	127,89 ± 48,01	3,89
26	128,02 ± 29,80	3,89
27	308,49 ± 52,25	3,51
28	574,84 ± 307,95	3,24
29	788,86 ± 408,66	3,10
<i>Conjunto teste</i>		
30	64,66 ± 13,76	4,19
31	105,07 ± 18,62	3,98
32	200,07 ± 122,73	3,70
3	345,66 ± 112,12	3,46

Os resultados da análise de HQSAR para os nove compostos do conjunto treinamento estão dispostos na Tabela 9.2. Como pode ser visto nessa tabela, o melhor resultado estatístico foi obtido com o modelo **6** ($Q^2 = 0,59$; $R^2 = 1,00$; com quatro componentes) seguido pelos modelos **2** ($Q^2 = 0,58$; $R^2 = 1,00$; com quatro componentes) e **7** ($Q^2 = 0,56$; $R^2 = 0,99$; com três componentes). O modelo **6** foi obtido usando átomos (A), ligações (B), conectividade (C) e hidrogênios (H) na distinção dos fragmentos. Outra observação que surge da análise da Tabela 9.2 é que a inclusão conjunta das características de doador/aceitador e hidrogênio na distinção do fragmento resultou em

modelos (10 e 15) com baixa capacidade preditiva (baixo Q^2). Esse resultado está de acordo com estudos prévios que sugerem para não usar as características doadoras/aceitadoras simultaneamente com hidrogênios. A explicação é que existe um substancial aumento do número de fragmentos gerados quando ambas as opções são usadas^[9]. Além disso, para várias outras combinações não foi possível sequer a obtenção de um modelo significativo (5, 8, 13 e 14) quando características doadoras/aceitadoras foram consideradas. Por outro lado, a inclusão da conectividade promove um aumento significativo na qualidade do modelo, onde o valor de Q^2 aumenta de 0,19 (modelo 1) para 0,58 (modelo 2). O mesmo pode ser dito a respeito da inclusão dos hidrogênios no modelo 3, onde o valor de Q^2 aumenta para 0,47.

Tabela 9.2 - Resultados da análise de HQSAR usando várias distinções de fragmentos e os principais parâmetros estatísticos que indicam a qualidade do modelo. Nessa primeira análise, foi usado o tamanho padrão do fragmento (4-7).

Modelo	Distinção de fragmentos	Q^2	R^2	SEP	SEE	HL	N
1	A/B	0,19	0,99	0,53	0,06	61	4
2	A/B/C	0,58	1,00	0,38	0,01	151	4
3	A/B/H	0,47	1,00	0,43	0,04	53	4
4	A/B/Ch	0,22	0,98	0,47	0,07	97	3
5	A/B/D						
6	A/B/C/H	0,59	1,00	0,38	0,03	53	4
7	A/B/C/Ch	0,56	0,99	0,35	0,05	151	3
8	A/B/C/D						
9	A/B/H/Ch	0,35	0,96	0,43	0,11	151	3
10	A/B/H/D	0,20	1,00	0,53	0,04	53	4
11	A/B/Ch/D						
12	A/B/C/H/Ch	0,52	0,99	0,41	0,05	53	4
13	A/B/C/H/D						
14	A/B/C/Ch/D						
15	A/B/C/H/Ch/D	0,05	0,91	0,47	0,15	53	2

Q^2 = coeficiente de correlação da validação cruzada; R^2 = coeficiente de correlação; SEE = erro padrão da estimativa; SEP = erro padrão da predição; HL = comprimento do holograma; N = número ótimo de componentes principais. Distinção de fragmentos: átomos (A), ligações (B), conectividade (C), hidrogênios (H), quiralidade (Ch) e doador/aceitador (D).

Na continuação da análise de HQSAR, o modelo 6 foi selecionado para avaliar o efeito do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos. O tamanho do fragmento controla o tamanho mínimo e máximo de um fragmento que será incluso no holograma

molecular. Estes são gerados para todos os fragmentos lineares, ramificados entre M e N átomos. Os parâmetros M e N podem ser ajustados para incluir fragmentos maiores ou menores no holograma. Contudo, o melhor modelo dessa análise produziu apenas um ligeiro aumento no valor de Q^2 (0.62). Em virtude disso, resolvemos considerar também o efeito do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos dos modelos 2 e 7.

Seis modelos foram gerados para avaliar o efeito do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando a combinação de fragmentos do modelo 2 (Tabela 9.3): átomos (A), ligações (B) e conectividade (C). A análise da Tabela 9.3 revela que a diminuição no tamanho do fragmento leva a um aumento significativo na qualidade dos modelos gerados. Destes, o modelo 16 foi o que apresentou os melhores parâmetros estatísticos ($Q^2 = 0,74$; $R^2 = 0,99$; com três componentes) usando o tamanho de fragmentos de 2-5 átomos. O modelo 17 (3-6) também resultou numa melhora dos valores dos parâmetros estatísticos ($Q^2 = 0,70$; $R^2 = 1,00$; com quatro componentes). Observa-se que à medida que o tamanho do fragmento aumenta, o valor de Q^2 diminui até chegar ao seu menor valor no modelo 21 ($Q^2 = 0,15$).

Tabela 9.3 - Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando a distinção dos fragmentos do modelo 2 (A/B/C).

Modelo	Tamanho do fragmento	Q^2	R^2	SEP	SEE	HL	N
16	2-5	0,74	0,99	0,27	0,04	53	3
17	3-6	0,70	1,00	0,32	0,02	151	4
18	4-7	0,58	1,00	0,38	0,01	151	4
19	5-8	0,56	0,99	0,35	0,05	151	3
20	6-9	0,31	1,00	0,49	0,03	151	4
21	7-10	0,15	1,00	0,55	0,03	61	4

Para o modelo 7, também foram gerados seis modelos (22-27) para avaliar o efeito do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando átomos (A), ligações (B), conectividade (C) e quiralidade (Ch) na distinção dos fragmentos. Da mesma forma que observado previamente, a diminuição no tamanho do fragmento leva a um aumento expressivo na qualidade dos modelos gerados. Os melhores parâmetros estatísticos ($Q^2 = 0,75$; $R^2 = 1,00$; com três componentes) foram obtidos no modelo 22 usando o tamanho de fragmentos de 2-5 átomos. Na Tabela 9.4 também é possível

constatar que um aumento no tamanho do fragmento, provoca uma diminuição nos valores de Q^2 , sendo que o modelo **27** ($Q^2 = 0,21$) foi o pior de todos.

Tabela 9.4 - Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando a distinção dos fragmentos do modelo 7 (A/B/C/Ch).

Modelo	Tamanho do fragmento	Q^2	R^2	SEP	SEE	HL	N
22	2-5	0,75	1,00	0,26	0,04	53	3
23	3-6	0,74	1,00	0,30	0,02	151	4
24	4-7	0,56	0,99	0,35	0,05	151	3
25	5-8	0,55	1,00	0,40	0,03	151	4
26	6-9	0,32	1,00	0,49	0,02	97	4
27	7-10	0,21	0,97	0,47	0,10	71	3

Os modelos **16** e **22** resultaram praticamente nos mesmos valores de Q^2 (0,74 e 0,75, respectivamente) bem como dos outros parâmetros estatísticos. Sendo assim, decidimos usar o modelo **16** para estimar os valores de pK_i^{ap} para os compostos do conjunto teste, já que este modelo é mais simples – a apenas átomos, ligações e conectividade são necessários na distinção de fragmentos – que o modelo **22** que usa átomos, ligações, conectividade e quiralidade na distinção de fragmentos.

Uma das características mais importantes dos modelos de HQSAR é o seu poder preditivo, que é definido como a capacidade do modelo em prever acuradamente a resposta biológica dos compostos que não foram usados na construção do modelo^[12]. A capacidade preditiva do modelo de HQSAR construído nesse trabalho foi estimada comparando-se os valores experimentais e preditos da resposta biológica (pK_i^{ap}) para os compostos do conjunto teste. Os resultados dessa análise estão dispostos na Tabela 9.5.

Tabela 9.5 - pK_i^{ap} experimental, predito e os valores dos resíduos para os compostos do conjunto teste.

Conjunto teste	pK_i^{ap} Experimental	pK_i^{ap} Predito	Resíduo
3	3,46	3,67	-0,21
30	3,70	3,57	0,14
31	3,98	3,53	0,46
32	4,19	3,75	0,44

Os valores de pK_i^{ap} preditos pelo modelo de HQSAR estão muito próximos dos valores experimentais. Para todos os compostos, o desvio entre o valor experimental e predito é menor que 0,5 unidades logarítmicas. A Figura 9.2 mostra o gráfico dos valores de pK_i^{ap} experimental *versus* pK_i^{ap} predito para os conjuntos treinamento e

teste. Os resultados mostram a existência de uma correlação linear satisfatória ($R^2 = 0,87$; desvio padrão = 0,18) entre a resposta biológica experimental e predita para ambos os conjuntos.

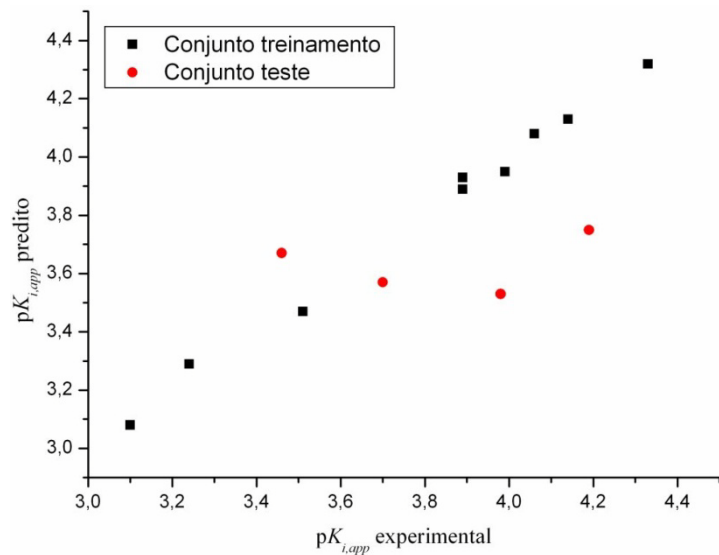
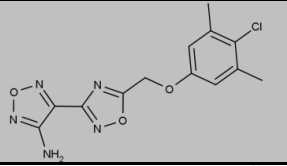
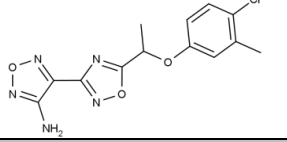
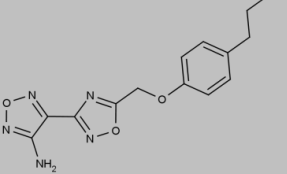
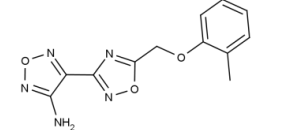
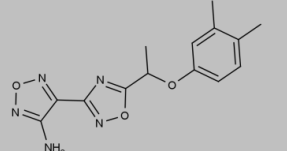
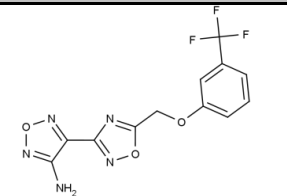
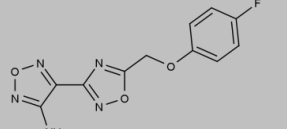
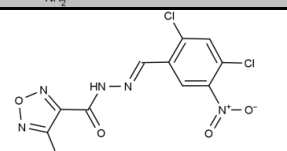
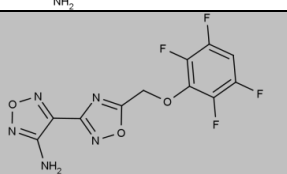


Figura 9.2 - Gráfico dos valores experimentais *versus* preditos de pK_i^{ap} para os compostos do conjunto treinamento e teste.

9.3.2 – Composto 8

Nessa análise de HQSAR apenas 9 compostos foram usados (Tabela 9.6), já que dois foram inativos. Como o número de compostos é muito pequeno, não foi possível realizar a divisão da coleção em conjunto teste e treinamento.

Tabela 9.6 - Estrutura e valores de K_i^{ap} (μM) e $\text{p}K_i^{ap}$ para os compostos análogos do composto 8.

Estrutura		K_i^{ap} (μM)	$\text{p}K_i^{ap}$
	8	$29,05 \pm 4,01$	4,54
	33	$35,76 \pm 11,77$	4,45
	34	$49,87 \pm 5,13$	4,30
	35	$93,24 \pm 18,17$	4,03
	36	$153,75 \pm 46,31$	3,81
	37	$163,75 \pm 37,87$	3,79
	38	$207,86 \pm 53,79$	3,68
	39	$556,40 \pm 347,00$	3,25
	40	$623,30 \pm 332,23$	3,21

A análise de HQSAR foi realizada primeiramente usando a tamanho padrão dos fragmentos (4-7). Quinze modelos foram construídos usando diferentes combinações na distinção dos fragmentos (Tabela 9.7). O modelo que gerou os melhores parâmetros estatísticos foi o modelo **14a** ($Q^2 = 0,53$; $R^2 = 0,99$; com quatro componentes) usando átomos (A), ligações (B), conectividade (C), quiralidade e doador/aceitador na distinção dos fragmentos. A inclusão da conectividade (modelo **2a**) não proporciona nenhum aumento na qualidade dos parâmetros estatísticos (comparando com o modelo **1a**). Por outro lado, a inserção da quiralidade e de características doadoras/aceitadoras (modelos **4a** e **5a**) produz valores significativos de Q^2 (0,50) de ambos os modelos.

Tabela 9.7 - Resultados da análise de HQSAR usando várias distinções de fragmentos e os principais parâmetros estatísticos que indicam a qualidade do modelo. Nessa primeira análise, foi usado o tamanho padrão do fragmento (4-7).

Modelo	Distinção de fragmentos	Q^2	R^2	SEP	SEE	HL	N
1a	A/B	0,16	0,83	0,51	0,23	53	1
2a	A/B/C	0,00	0,86	0,56	0,21	307	2
3a	A/B/H	0,37	0,97	0,49	0,10	59	3
4a	A/B/Ch	0,50	0,97	0,48	0,11	53	4
5a	A/B/D	0,50	0,98	0,48	0,11	257	4
6a	A/B/C/H	0,12	0,62	0,48	0,32	71	1
7a	A/B/C/Ch	0,01	0,86	0,55	0,21	307	2
8a	A/B/C/D	0,50	0,99	0,48	0,06	307	4
9a	A/B/H/Ch	0,22	0,96	0,54	0,12	53	3
10a	A/B/H/D	0,38	1,00	0,54	0,03	59	4
11a	A/B/Ch/D	0,48	0,95	0,49	0,15	53	4
12a	A/B/C/H/Ch	0,08	0,64	0,49	0,31	83	1
13a	A/B/C/H/D	0,46	1,00	0,50	0,04	71	4
14a	A/B/C/Ch/D	0,53	0,99	0,47	0,07	307	4
15a	A/B/C/H/Ch/D	0,17	0,75	0,47	0,26	257	1

Os modelos **5a**, **8a** e **14a** foram selecionados para avaliar o efeito do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos. Contudo, os modelos construídos usando a combinação encontrada da distinção de fragmentos dos modelos **5a** (A/B/D) e **14a** (A/B/C/Ch/D) não forneceram nenhuma melhora significativa nos valores de Q^2 . Estes valores foram: 0,52 (modelo **5a**; 5-8 átomos) e 0,56 (modelo **14a**; 2-5 átomos), respectivamente. Já a variação no tamanho do fragmento para modelo **8a** (A/B/C/D) promove um aumento expressivo na qualidade dos parâmetros estatísticos (Tabela 9.8). O melhor modelo obtido foi o modelo **22a** ($Q^2 = 0,68$; $R^2 = 0,99$; com quatro

componentes) usando o tamanho de fragmentos de 2-5 átomos. Novamente foi observado que o aumento deste parâmetro provoca uma queda no valor do Q^2 .

Tabela 9.8 - Influência do tamanho do fragmento nos parâmetros estatísticos usando a distinção dos fragmentos do modelo **8a** (A/B/C/D).

Modelo	Tamanho do fragmento	Q^2	R^2	SEP	SEE	HL	N
22a	2-5	0,68	0,99	0,38	0,08	83	4
23a	3-6	0,59	0,98	0,44	0,10	59	4
24a	4-7	0,50	0,99	0,48	0,06	307	4
25a	5-8	0,38	0,95	0,54	0,15	71	4
26a	6-9	0,14	0,95	0,63	0,16	151	4
27a	7-10	0,15	0,97	0,63	0,13	307	4

As estruturas dos compostos podem ser apresentadas graficamente numa análise de HQSAR usando um código de cores. Cada átomo é colorido de acordo com a sua contribuição para a atividade observada do composto. As cores do lado vermelho do espectro (vermelho, laranja avermelhado, laranja) refletem as contribuições negativas, enquanto que as cores da extremidade verde do espectro (amarelo, azul esverdeado e verde) refletem as contribuições positivas para a resposta biológica. Átomos com contribuições intermediárias são coloridos de branco e os átomos do esqueleto base são coloridos de azul. A contribuição individual de cada átomo para o composto mais potente (composto **8**) encontrado nesse trabalho é mostrada na Figura 9.3.

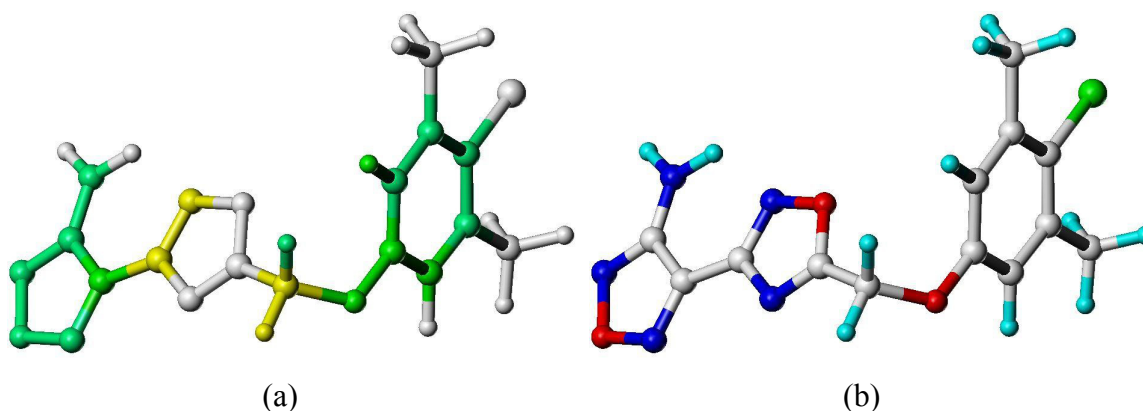


Figura 9.3 - (a) contribuição individual de cada átomo para o composto **8**; (b) estrutura do composto **8** colorida de acordo com seus átomos: carbono (cinza); oxigênio (vermelho); nitrogênio (azul); hidrogênio (ciano); cloro (verde).

Como pode ser visto na Figura 9.3, o grupo amino-1,2,5-oxadiazol contribui de maneira fortemente favorável para a resposta biológica do composto **8**, assim como o

anel benzênico. Já o anel 1,2,4-oxadiazol que está no meio da molécula, também contribui para a resposta biológica, mas com uma menor intensidade. A evidência de que esse anel é importante surge da observação de que no composto **39**, não considerando as outras diferenças presentes, a sua ausência provoca uma diminuição de 1,29 unidades logarítmicas na resposta biológica. Apesar dessa queda no valor de pK_i^{ap} o fato desse composto ter sido ativo sugere que essa região poderia ser explorada visando a identificação de um composto mais potente. Outra observação interessante é que a substituição de grupos lipofílicos ligados ao anel benzênico por grupos polares provoca uma diminuição na potência dos compostos e o ápice dessa queda ocorreu no composto **40** que apresenta quatro átomos de flúor ligados ao anel benzênico (Tabela 9.6).

9.4 – Referências

- [1] WATERBEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.
- [2] KUBINYI, H. SAR and 3D QSAR in drug design. Part 2: applications and problems. **Drug Discov. Today**, v. 2, n. 12, p. 538-546, 1997.
- [3] SUTHERLAND, J. J.; O'BRIEN, L. A.; WEAVER, D. F. A comparison of methods for modeling quantitative structure-activity relationships. **J. Med. Chem.**, v. 47, n. 22, p. 5541-5554, 2004.
- [4] PATRIC, G. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. New York: Oxford University Press, 1995. 768p.
- [5] TROPSHA, A. Application of Predictive QSAR Models to Database Mining. In: OPREA, T. I. **Chemoinformatics and Drug Discovery**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004. p. 437-453.
- [6] CRAMER, R. D. III. Partial Least Squares (PLS): Its Strengths and Limitations. **Persp. in Drug Discov and Des.**, v. 1, n. 1., p. 269-278, 1993.
- [7] TONG, W.; LOWIS, D. R.; PERKINS, R.; CHEN, Y.; WELSH, W. J.; GODDETTE, D. W.; HERITAGE, T. W.; SHEEHAN, D. M. Evaluation of Quantitative Structure-Activity Relationship Methods for Large-Scale Prediction of Chemicals Binding to the Estrogen Receptor. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 38, n. 4, p. 669-677, 1998.
- [8] LOWIS, D. R., HQSAR: a new, highly predictive QSAR technique. Disponível em: <http://tripos.com/data/SYBYL/HQSAR_Application_Note_072605.pdf>. Acesso em: 13 abr. 08
- [9] HQSARTM **Manual**. Disponível em: <http://tripos.com/index.php?family=modules,SimplePage,sybyl_hqsar>. Acesso em: 13 abr. 08.
- [10] JAIN, A. N. J. Ligand-based structural hypotheses for virtual screening. **J. Med. Chem.**, v. 47, n. 4, p. 947-961, 2004.
- [11] FREITAS, R. F.; OPREA, T. I.; MONTANARI, C. A. 2D QSAR and similarity studies on cruzain inhibitors aimed at improving selectivity over cathepsin L. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 2, p. 838-853, 2008
- [12] GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. **Mol. Diversity**, v. 5, n.4, p. 231-243, 2000.

CAPÍTULO 10



Conclusões e Perspectivas

Este capítulo apresenta as conclusões desta tese de doutorado que envolveu o uso de métodos em quiminformática e experimentais na identificação de novos inibidores da GAPDH de *T. cruzi*. Além disso, são apresentadas as perspectivas futuras para a continuação deste trabalho.

10 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

10.1 - Conclusões

A doença de Chagas é uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo. Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento dessa doença foram introduzidos há bastante tempo e apresentam uma série de efeitos colaterais, além de serem eficazes apenas na fase aguda da doença. Nesse contexto, a busca por novos compostos mais eficazes e menos tóxicos é essencial para aliviar o sofrimento de milhões de pessoas que estão infectadas por essa doença.

O desafio da quiminformática é encontrar as prováveis regiões que contêm compostos biologicamente ativos, conhecidas como espaço químico-biológico. Nesse sentido, os métodos em quiminformática, tais como: o ensaio virtual e o planejamento baseado na estrutura do alvo foram essenciais para o desenvolvimento desta tese, já que estes permitiram a realização de buscas em grandes coleções de compostos visando à seleção de um número reduzido de compostos que apresentem alta probabilidade de serem ativos nos ensaios experimentais contra a enzima GAPDH de *T. cruzi*. Com a aplicação desses métodos foi possível reduzir o espaço químico a ser investigado, permitindo-se realizar a seleção de vinte compostos com potencial para inibir a enzima. Além de serem extremamente úteis do ponto de vista prospectivo, os métodos em quiminformática possibilitaram também a realização de análises retrospectivas, as quais foram usadas para elucidar o processo de reconhecimento molecular da GAPDH pelos ligantes e formular hipóteses para explicar a atividade biológica observada.

A técnica de ITC mostrou ser extremamente sensível, permitindo-se acompanhar a cinética da reação e obter os valores de K_i^{ap} de maneira precisa e acurada. Além disso, esse é um método não destrutivo e universal para qualquer reação enzimática onde haja fluxo de calor. Também, diferente dos métodos espectrofotométricos, a técnica de ITC pode ser usada em soluções opacas e não necessita que o substrato contenha grupos cromóforos ou fluoróforos. Essa técnica foi usada na obtenção dos parâmetros cinéticos da enzima GAPDH de *T. cruzi* em relação ao G3P e de maneira inédita para o cofator NAD^+ . Ela também foi empregada para avaliar a capacidade dos compostos selecionados em inibir a enzima. Dos vinte compostos testados, onze inibiram a GAPDH, sendo: sete competitivos, um não-competitivo e três incompetitivos. Com isso, a taxa de acerto obtida nesta tese, considerando apenas os compostos com

$K_i^{ap} < 100 \mu\text{M}$, foi de 20%. Esse é um número apreciável, já que na literatura ele gira em torno de 1-10% quando o planejamento *in silico* é realizado. Se comparado às taxas de acerto obtidas através dos métodos de ensaio em larga escala (HTS), que está ente 0-2 %, os resultados alcançados neste trabalho são ainda mais expressivos.

A maioria dos inibidores encontrados nesta tese possuem uma massa molecular em torno de 300 Da e cerca de 23 átomos pesados. Isso quer dizer que eles apresentam uma eficiência do ligante apropriada para que possam ser selecionados para a fase de otimização. Como esses ligantes são menos complexos, poderíamos adicionar em média mais 14 átomos até que o composto atinja uma massa molecular de aproximadamente 500 Da. Dessa forma o ligante teria a sua potência aumentada, mantendo-se o perfil farmacocinético adequado.

Além da afinidade, a seletividade é uma propriedade essencial para um inibidor enzimático quando o alvo de interesse também possui enzimas similares no homem, tanto do ponto de vista estrutural quanto funcional. Este aspecto foi considerado desde a seleção dos compostos. Através da docagem consensual, foi possível priorizar a seleção de moléculas que apresentassem alta complementaridade pela GAPDH do *T. cruzi* e baixa complementaridade frente a GAPDH de humanos. O estudo de seletividade realizado na enzima de coelho, que é um modelo para a enzima de humanos, confirmou que os inibidores da GAPDH de *T. cruzi* apresentaram valores de seletividade da ordem de 4-14 vezes. Mesmo não sendo muito elevada, esses resultados são animadores, já que estes compostos são considerados apenas ligantes e ainda não foram submetidos a nenhuma otimização estrutural.

Além de inibir o alvo bioquímico, os compostos devem ser capazes de inibir as formas infectivas do parasito para que possam ser considerados candidatos a compostos-matrizes. Dessa forma, os inibidores da GAPDH de *T. cruzi*, foram avaliados através de ensaios *in vitro* contra a forma tripomastigota do parasito. Dois compostos foram capazes de inibir essa forma infectiva com elevada potência, com valores de IC_{50} de 53,4 μM (composto **3**) e 109,7 μM (composto **8**), respectivamente. Além disso, o composto **3** exibiu uma potência significativamente maior contra a forma amastigota do *T. cruzi*: $\text{IC}_{50} = 10,02 \mu\text{M}$. Ainda, estudos em células da linhagem LLCMK2 mostraram que esse composto apresenta baixa citotoxicidade ($\text{IC}_{50} = 1294 \mu\text{M}$).

Até o presente momento, todos os modelos de QSAR construídos para a enzima GAPDH de tripanossomatídeos são baseados em análogos de nucleosídeos, os quais apresentam afinidade pelo sítio do cofator NAD^+ . Além disso, esses modelos foram gerados de maneira retrospectiva. Já o modelo de QSAR reportado nesta tese, é o primeiro a ser construído de maneira prospectiva a partir de inibidores competitivos do G3P. Estudos de QSAR foram realizados com as duas melhores classes de inibidores da enzima e do parasito. Usando o método de holograma QSAR (HQSAR), modelos estatisticamente significantes e com elevado poder preditivo interno e externo foram construídos. Com esses estudos, foi possível identificar características estruturais essenciais para a resposta biológica observada e também auxiliar no melhor entendimento do processo de reconhecimento molecular ligante-receptor. Certamente os resultados obtidos com os estudos de HQSAR irão ser de grande importância no futuro para a otimização dos novos inibidores encontrados nesta tese.

Por fim, a união dos métodos em quiminformática com a técnica de ITC permitiu que esta tese desse uma importante contribuição para o futuro da quimioterapia da doença de Chagas, encontrando-se não somente novos inibidores potentes e com alguma seletividade pela enzima GAPDH de *T. cruzi*, mas também inibidores das formas infectivas do parasito.

10.2 – Perspectivas

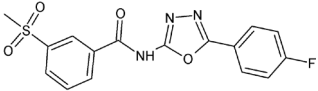
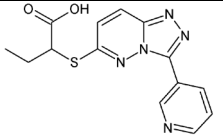
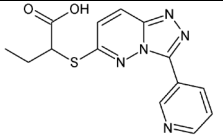
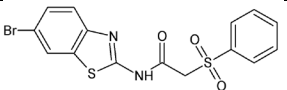
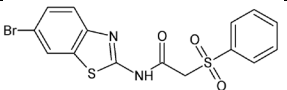
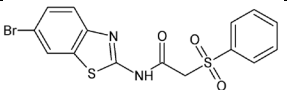
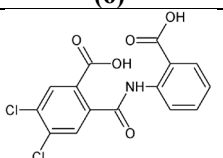
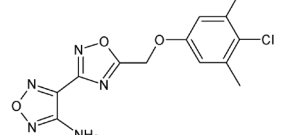
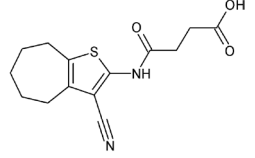
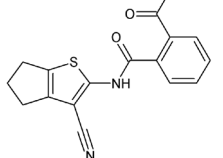
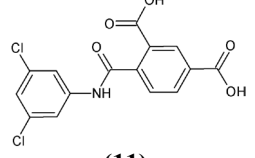
Com a identificação de novos ligantes da GAPDH de *T. cruzi*. A etapa posterior da gênese planejada de fármacos é a otimização dos ligantes em compostos-matrizes. Nesse sentido, os melhores inibidores encontrados nesta tese estão sendo selecionados para a otimização da estrutura química desses compostos. Para isso, a cristalografia raios-X será usada na determinação estrutural dos complexos enzima-inibidor. Essa técnica irá fornecer evidências diretas da posição do inibidor e das interações deste com o alvo, que em conjunto fornecem informações suficientes para a descrição do modo de interação (MOB). Consequentemente, o conhecimento da estrutura tridimensional do complexo enzima-inibidor irá auxiliar na proposição de modificações estruturais dos compostos através da introdução de substituintes que irão melhorar as interações com a GAPDH, resultando num aumento da afinidade e da seletividade.

A calorimetria de titulação isotérmica também será empregada nas etapas de otimização dos ligantes em compostos-matrizes. Com essa técnica será possível obter a constante de associação (K_B), a estequiometria da reação (n), a entalpia (ΔH) e a entropia (ΔS) de interação. Além disso, essa técnica irá fornecer a assinatura termodinâmica da interação ligante-GAPDH e sua análise será essencial para o completo entendimento do processo de reconhecimento molecular entre a enzima e os ligantes.

Paralelamente aos estudos estruturais e energéticos, os inibidores análogos dos compostos **3** e **8**, serão enviados para o professor Sérgio de Albuquerque para a realização de novos ensaios contra as formas infectivas do *T. cruzi*. Além disso, devido aos excelentes resultados apresentados pelo composto **3** contra as duas formas infectivas do parasito, este composto foi selecionado para o início de estudos *in vivo* e também para os ensaios contra a forma tripomastigota sanguínea de *T. cruzi* (cepa Y).

ANEXO

Tabela A1 – Propriedades 1D dos compostos ativos contra a GAPDH de *T. cruzi*.

Composto	MM ¹	LogP ²	HBA ³	HBD ⁴	PSA ⁵	RB ⁶
 (1)	361,35	2,38	7	1	102,16	5
 (2)	315,35	2,92	7	0	96,10	5
 (3)	326,39	2,42	5	2	74,85	5
 (4)	411,29	3,33	5	1	76,13	5
 (5)	276,33	1,43	5	2	74,85	5
 (6)	336,82	2,12	5	2	74,85	5
 (7)	354,14	3,55	6	1	109,36	5
 (8)	321,72	2,52	8	1	113,09	4
 (9)	292,35	2,12	5	1	93,02	5
 (10)	312,34	2,82	5	1	93,02	4
 (11)	354,14	3,55	6	1	109,36	5

¹Massa molecular; ²Coefficiente de participação; ³Aceitadores em ligações de hidrogênio; ⁴Doadores em ligações de hidrogênio; ⁵Área superficial polar; ⁶Ligações livres.