

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

IVANI PAULI

Planejamento de inibidores da enzima cruzaina candidatos a fármacos
para o tratamento da doença de Chagas

São Carlos

2016

IVANI PAULI

Planejamento de inibidores da enzima cruzaina candidatos a fármacos
para o tratamento da doença de Chagas

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

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2016

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

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

Pauli, Ivani

Planejamento de inibidores da enzima cruzafina
candidatos a fármacos para o tratamento da doença de
Chagas / Ivani Pauli; orientador Adriano Defini
Andricopulo - versão corrigida -- São Carlos, 2016.
131 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

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

Ao meu pai. Com o mais profundo amor, admiração e gratidão. Pela
incansável dedicação. Por ter me inspirado a estar aqui hoje.
Onde estiver, estará sorrindo neste dia.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos e Laboratório de Química Medicinal e Computacional, que se tornaram a extensão de casa durante os anos do doutorado.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de doutorado no país (2011/13789-6) e doutorado sanduíche no exterior – BEPE (2014/26324-0).

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

Ao Professor Luiz Carlos Dias, da UNICAMP, e sua competente equipe: Brian Slafer, Celso Rezende, Marco Dessoay, Rafael Ferreira e Thiago Sampaio pela síntese dos compostos, etapa essencial para a realização deste trabalho.

À Professora Rafaela Salgado Ferreira, da UFMG, por todos os ensinamentos compartilhados e discussões sobre o projeto.

À Mariana Laureano e à Simone Michelan Duarte pelos ensinamentos sobre ensaios enzimáticos e purificação da cruzaina.

À Wanessa Altei e à Luma Godoy Magalhães pelos conhecimentos compartilhados sobre o cultivo de células e ensaios celulares e à Renata Krogh pelos ensaios em *T. cruzi*.

À Dra. Sonia Maria de Moraes, diretora do departamento de metabolismo e farmacocinética (DMPK) da AbbVie, pela oportunidade ímpar de estagiar nesta empresa tão importante no cenário mundial da indústria farmacêutica e por colocar à disposição todo o aparato experimental dos seus laboratórios.

À toda a família DMPK por ter me acolhido e compartilhado tantos conhecimentos, de forma tão doce e gentil, durante este ano de doutorado sanduíche na AbbVie. Em especial à DeAnne Stolarick e Monica Hoertel, por não medirem esforços e pela paciência em lidar com a burocracia para que o estágio fosse possível. Ao Ryota Kikushi, pela supervisão direta do meu trabalho e pelos ensinamentos compartilhados sobre MPO. Ao Anthony Lee pela confiança no meu trabalho. À Hong Liu, pelos ensinamentos sobre a biotransformação e sobre a vida. À Stella Doktor pelas inúmeras vezes em que fez o impossível para que o trabalho pudesse ser

realizado. Ao Joseph Kalkcist por não medir esforços para que os compostos chegassem sãos e salvos.

Ao Dale Kempf, pelas discussões sempre carregadas de conteúdo e gentileza nas reuniões do grupo LOLA (*Lead Optimization Latin America*), parte das iniciativas do DNDi na AbbVie.

À Lívia Maria Faim, Daiana Evelyn Martil e Raíssa Gutierrez, pela amizade incondicional desde a minha primeira visita à São Carlos. Pelos ensinamentos compartilhados sobre a ciência, o laboratório e a vida.

Ao Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers, por apoiar incondicionalmente os meus sonhos, compartilhar e vivenciar comigo conhecimentos sobre ciência e sobre a vida.

À inesquecível sala 09: Wanessa Altei, Mariana Laureano de Souza, Renata Krogh, Ana Isabela Sales e Simone Michelin Duarte, por tornarem os dias sempre agitados e divertidos.

À Karina Matos, Luma Godoy Magalhães e Mariana Laureano de Souza pela amizade e evolução vivenciadas no dia a dia do laboratório.

À Ilaria Badagnani, Adriana Caballero, Kuei Tseng, Belen Tornesi, Joanna Dabrowska, Marcin Kwiska, Fabio Re, Geeth Gunawardana, Kaiwen, Bradley Hooker pela amizade, pelas discussões sobre ciência, sociedade, filosofia, vinhos, cervejas, limoncellos, seja no Metra ou na Casa del Pueblo, enfim, por terem me adotado durante minha estadia em Chicago.

À Diane Korling, Kristen Laricchia, Dmitry Zhdanov e Scot Abrahamson, pela experiência incrível de morar na “*Central House*” de Evanston.

Ao Anton Dokov, pelas interessantíssimas discussões sobre a história do mundo, ciência e a beleza da vida.

À minha família pelo amor incondicional, pelo apoio incondicional, pela amizade incondicional, pelo porto seguro e por entender, por mais que fosse doída, a minha ausência enquanto eu batalhava por este sonho.

A todos que, mesmo não citados nominalmente, deixaram um pouco de si, contribuindo para que este trabalho fosse possível ou que a vida se tornasse mais leve enquanto ele estava sendo executado.

“Não há no mundo exagero mais belo do que a gratidão”

Jean de la Bruyere

“O estudo, a busca da verdade e da beleza são domínios em que nos é consentido sermos crianças por toda a vida”

Albert Einstein

RESUMO

PAULI, I. **Planejamento de inibidores da enzima cruzaina candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas**. 2016. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada de alta prioridade nos programas de pesquisa e desenvolvimento da Organização Mundial da Saúde. Grave problema de saúde pública, é uma das maiores causas de desordens cardíacas em vários países da América Latina. A inexistência de um tratamento satisfatório faz urgente a busca por novas alternativas terapêuticas. Nesse contexto, o objetivo dessa tese de doutorado foi o desenvolvimento de inibidores da enzima cruzaina de *Trypanosoma cruzi*, alvo molecular validado para a doença de Chagas, utilizando de forma integrada várias estratégias experimentais e computacionais de química medicinal e planejamento de fármacos. Duas classes de inibidores foram utilizadas como compostos líderes: derivados benzimidazólicos e imídicos. Diversas etapas de planejamento, síntese química e avaliação biológica foram realizadas de forma iterativa até que a otimização da potência dos compostos fosse alcançada. Modificações em diversas regiões de cada composto líder foram exploradas, levando ao entendimento de requerimentos de SAR essenciais para a inibição enzimática. O mecanismo de inibição de novas séries de compostos foi determinado. Estudos preliminares de toxicidade, em linhagens celulares e *in vivo*, mostraram que os compostos apresentam um perfil seguro. Por meio da realização de um estágio de doutorado sanduíche no departamento de metabolismo de fármacos e farmacocinética da empresa farmacêutica norte-americana AbbVie, foi realizada a determinação de parâmetros farmacocinéticos dos compostos investigados. Além disso, foi possível a utilização de uma metodologia recentemente implementada na empresa, com foco na otimização de múltiplos parâmetros de um composto teste. Este método foi utilizado para a identificação de candidatos a novos fármacos com um equilíbrio favorável entre potência e parâmetros farmacocinéticos, que são absolutamente essenciais para o desenvolvimento de um novo fármaco eficaz e seguro. Por fim, foi criada uma estratégia mais racional e efetiva para a triagem de candidatos a novos antichagásicos, que apresentem uma combinação otimizada de potência e propriedades de ADME.

Palavras-chave: Doença de Chagas. Cruzaina. Química medicinal. Planejamento de fármacos. ADME.

ABSTRACT

PAULI, I. **Design of new cruzain inhibitors as drug candidates for the treatment of Chagas' disease**. 2016. 131 p. Tese Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Chagas' disease is considered a high priority neglected tropical disease by the World Health Organization in its research and development programs. It is a serious public health problem, being among the main causes of cardiac disorders in many countries in Latin America. The absence of an effective treatment makes urgent the pursue of novel therapeutic options. In this way, the goal of this PhD thesis was to develop inhibitors of the enzyme cruzain, the main cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*, a validated target for Chagas' disease drug discovery. This work involved the combination of experimental and computational approaches in medicinal chemistry and drug design. Two sets of inhibitors were used as lead compounds: benzimidazole and imide derivatives. The design, chemical synthesis and biological evaluation of several compounds were performed iteratively, until the optimization of potency was achieved. Modifications in different regions of each lead compound were explored, making it possible to understand the SAR requirements for enzyme inhibition. The mode of inhibition of the compounds was determined. Preliminary toxicity studies were carried out using cellular lineages and mice, showing that the compounds possess a safe profile. A PhD internship at the department of metabolism and pharmacokinetics at the U.S. pharmaceutical company AbbVie led to the determination and optimization of the pharmacokinetic profile of the inhibitors. Besides, a methodology recently implemented in the company was employed in this work, which aims a multi parametric optimization of the test compounds. This method was used to identify drug candidates with a favorable balance between potency and pharmacokinetic parameters, which are absolutely essential to develop a new, safe and effective drug. Finally, it was created a rational and more effective strategy for the screening of new antichagasic drug candidates, presenting an optimized combination of potency and ADME properties.

Keywords: Chagas' disease. Cruzain. Medicinal chemistry. Drug design. ADME.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 2 –	Distribuição mundial de casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , com base em estimativas oficiais da transmissão vetorial, no período de 2006 a 2009.....	24
Figura 3 –	Duas fases clínicas de manifestação da doença de Chagas. A primeira, conhecida como fase aguda e, a segunda, como fase crônica.....	26
Figura 4 –	Modelo de interação enzima-substrato para proteases.....	28
Figura 5 –	Estrutura 3D da cruzaina.....	29
Figura 6 –	Sítio de ligação da Cruzaina, onde são destacados seus principais subsítios: S1, S2, S3 e S1'.....	30
Figura 7 –	Subsítio S2 da cruzaina, com destaque para a sua composição hidrofóbica e a flexibilidade do Glu208.....	30
Figura 8 –	Odanacatib, K777 e outros exemplos de classes de inibidores da cruzaina.....	33
Figura 9 –	Integração das metodologias utilizadas nesse trabalho de tese de doutorado.....	39
Figura 10 –	Modo de ligação intermolecular no sítio ativo, estrutura química e afinidade dos inibidores competitivos da cruzaina, compostos líderes deste trabalho.....	40
Figura 11 –	Gel SDS PAGE 12% das amostras da primeira etapa da purificação da cruzaina em resina de afinidade.....	43
Figura 12 –	Gel SDS PAGE 12% após a última etapa de purificação, mostrando a diminuição do peso molecular da cruzaina após o processo de ativação.....	44
Figura 13 –	Esquema da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC, utilizado neste trabalho para determinação dos parâmetros cinéticos.....	45
Figura 14 –	Esquemática da estrutura de um poço da placa utilizada para o experimento de PAMPA.....	52
Figura 15 –	Modo de ligação do derivado benzimidazólico (composto líder) de acordo com a estrutura cristalográfica em complexo com a cruzaina (PDB: 3KKU).....	62
Figura 16 –	Esquema de SAR para a otimização da série de derivados benzimidazólicos contra a cruzaina.....	66
Figura 17 –	Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto mais potente, 14	66
Figura 18 –	Racional para a N-substituição no benzimidazol.....	72
Figura 19 –	Gráfico de Lineweaver-Burk para o composto 47	74
Figura 20 –	Gráfico de Lineweaver-Burk para o composto 51	75
Figura 21 –	Gráfico de <i>Lineweaver-Burk</i> e estrutura química dos compostos A) 11; B) 52; C) 54; D) 53	77
Figura 22 –	Representação da interação dos substituintes no anel fenil com o Glu208. A) 63 . B) 65 . C) 68	81
Figura 23 –	Avaliação da citotoxicidade de compostos representativos da série de derivados benzimidazóis.....	82

Figura 24 –	<i>Clearance_u</i> IVIVC – boa correlação, mas ainda afastado do espaço fármaco-similar.....	86
Figura 25 –	Estabilidade dos compostos avaliada após incubação com hepatócitos humanos e representada como valores de <i>clearance</i>	89
Figura 26 –	Biotransformação do composto 1	92
Figura 27 –	Biotransformação do composto 13	93
Figura 28 –	Biotransformação do composto 8	93
Figura 29 –	Biotransformação do composto 40	94
Figura 30 –	Resumo dos resultados obtidos do experimento de biotransformação.....	95
Figura 31 –	Compostos planejados para aumentar a estabilidade metabólica.....	95
Figura 32 –	Influência da permeabilidade e da ligação dos compostos às proteínas do meio de cultura....	97
Figura 33 –	Representação gráfica dos valores de <i>clearance</i> intrínsecos pela incubação dos compostos com microsomos de fígado humano.....	103
Figura 34 –	Correlação entre os valores de <i>clearance</i> intrínseco e a hidrofobia dos compostos.....	104
Figura 35 –	Estudos de SAR dos parâmetros farmacocinéticos <i>in vitro</i>	105
Figura 36 –	Comparação entre as pontuações MPO para os compostos da série de derivados benzimidazólicos dos dois conjuntos avaliados.....	107
Figura 37 –	<i>Clearance</i> IVIVC.....	108
Figura 38 –	Estrutura química do segundo composto líder (2).....	110
Figura 39 –	Modos de ligação preditos por modelagem molecular dos compostos líder (verde) e 95 (salmão).....	114
Figura 40 –	Resumo das investigações de SAR para a otimização da série de derivados imídicos contra a cruzaina.....	114
Figura 41 –	Gráficos de duplo-recíproco de <i>Lineweaver-Burk</i> para os compostos 94 (A) , 95 (B) e 102 (C)	115
Figura 42 –	Esquema de triagem para novos candidatos a antichagásicos, considerando a otimização de múltiplos parâmetros (MPO).....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estruturas e atividade inibitória dos compostos 1-19 contra a enzima cruzaina.....	60
Tabela 2 –	Estruturas e atividade inibitória dos derivados 20, 21, 22 e 23 contra a enzima cruzaina.....	62
Tabela 3 –	Estruturas e atividade de inibição da cruzaina para os derivados da substituição do benzimidazol.....	63
Tabela 4 –	Estruturas e perfis de inibição dos compostos com benzimidazo-2-il C- ou N-substituído.....	65
Tabela 5 –	Atividade <i>in vitro</i> dos inibidores mais potentes da cruzaina contra o <i>T. cruzi</i>	67
Tabela 6 –	Doses cumulativas dos compostos avaliados em camundongos.....	70
Tabela 7 –	Toxicidade aguda dos compostos selecionados.....	70
Tabela 8 –	Resultados da avaliação de proliferação celular.....	71
Tabela 9 –	Estruturas e inibição dos compostos N-substituídos benzimidazólicos.....	73
Tabela 10 –	Ensaio de sensibilidade ao detergente Triton X100 na inibição da cruzaina.....	74
Tabela 11 –	Confirmação do mecanismo do tipo não-competitivo dos compostos 47 e 51	75
Tabela 12 –	Estruturas e inibição dos novos derivados benzimidazólicos N-substituídos.....	76
Tabela 13 –	Confirmação do mecanismo do tipo não-competitivo dos compostos 53 e 54	77
Tabela 14 –	Atividade <i>in vitro</i> e propriedades físico-químicas de derivados N-substituídos benzimidazólicos contra o <i>T. cruzi</i>	79
Tabela 15 –	Estrutura e propriedades inibitórias de derivados benzimidazólicos com substituições na fenila.....	80
Tabela 16 –	Avaliação biológica de derivados benzimidazólicos contra o <i>T.cruzi</i> e culturas celulares de HFF1.....	82
Tabela 17 –	Estrutura e perfil farmacocinético <i>in vitro</i> da série de derivados benzimidazólicos.....	85
Tabela 18 –	Estrutura e perfil farmacocinético <i>in vivo</i> de derivados benzimidazólicos, utilizando-se camundongos.....	87
Tabela 19 –	Valores de CL _{int_u} (L/h/kg) e fração metabolizada (%) para diferentes isoformas do CYP450.....	91
Tabela 20 –	Fração livre de composto (fu) na presença de 10 % de SFB e permeabilidade dos compostos avaliada pelo ensaio de PAMPA.....	96
Tabela 21 –	Estrutura e perfil farmacocinético <i>in vitro</i> para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos.....	98
Tabela 22 –	Pontuação MPO e os parâmetros utilizados para o seu cálculo.....	106
Tabela 23 –	Estrutura e perfil farmacocinético <i>in vivo</i> para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se camundongos.....	109
Tabela 24 –	Estruturas e perfil de inibição de derivados do composto líder 2 contra a cruzaina.....	110
Tabela 25 –	Atividade <i>in vitro</i> de derivados imídicos contra o <i>T. cruzi</i>	116

Tabela 26 – Estrutura e perfil farmacocinético <i>in vitro</i> para a série de derivados imídicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.....	117
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-ABT	Aminobenzotriazol
3D	Tridimensionais
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
BZ	Benznidazol
CL _{int}	Clearance intrínseco determinado in vitro utilizando microsossomos
CL _p	Clearance intrínseco determinado in vivo utilizando camundongos
DDI	Drug-drug interactions
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTN	Doença Tropical Negligenciada
F	Biodisponibilidade
FDA	Food and Drug Administration
fu	Fraction unbound
HERG	Canal cardíaco de potássio humano clonado
HTS	High-Throughput Screening
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
IS	Índice de seletividade
IVIVC	Correlação in vitro x in vivo
LB	Luria Bertani
LBDD	Ligand Based Drug Design
LIT	Liver Infusion Triptose
MPO	Multi Parametric Optimization
NCEs	New Chemical Entities
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PDB	Protein Data Bank
PK	Farmacocinéticos
PSA	Polar Surface Area
QSAR	Quantitative Structure-Activity Relationships
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAR	Structure Activity Relationships

SBDD	Structure Based Drug Design
SBVS	Structure-Based Virtual Screening
SFB	Soro Fetal Bovino
SOM	Sites Of Metabolism
UHPLC	Ultra High Pressure Liquid Chromatography
Z-Phe-Arg-AMC	Benzoiloxycarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 A doença de Chagas.....	23
1.2 Proteases.....	27
1.3 Cruzaína.....	28
1.4 Planejamento de inibidores da cruzaína.....	31
1.5 Otimização de candidatos a fármacos por estratégias de SBDD e LBDD.....	33
1.6 O estudo de propriedades farmacocinéticas e a otimização múltipla de parâmetros...	35
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3 METODOLOGIA.....	39
3.1 Planejamento de inibidores da cruzaína de <i>T. cruzi</i>	40
3.2 Síntese de derivados dos compostos líderes 4 e 5	41
3.3 Expressão da cruzaína de <i>T. cruzi</i>	41
3.4 Purificação da cruzaína de <i>T. cruzi</i>	42
3.5 Ensaio enzimáticos.....	44
3.6 Docagem molecular.....	46
3.7 Parasitas e cultura celular.....	46
3.8 Ensaio contra a forma intracelular amastigota do <i>T. cruzi</i>	47
3.9 Ensaio de citotoxicidade em fibroblastos humanos HFF1.....	48
3.10 Ensaio de pré-toxicidade <i>in vivo</i>	48
3.11 Estabilidade metabólica <i>in vitro</i> determinada utilizando microsossomos de fígado.....	49
3.12 Estabilidade determinada pela utilização de enzimas CYP450 recombinantes.....	50
3.13 Determinação da estabilidade metabólica em hepatócitos.....	51
3.14 Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA).....	52
3.15 Determinação experimental do Log <i>D</i>	53
3.16 Determinação da fração livre dos compostos (fu).....	54
3.17 Biotransformação e análise dos metabólitos formados após incubação do composto teste com microsossomos.....	55
3.18 Determinação das propriedades farmacocinéticas <i>in vivo</i>	56
3.19 Análise por LC-MS/MS e cálculo das propriedades farmacocinéticas.....	56

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4.1 Planejamento e avaliação de derivados benzimidazólicos – composto líder 1.....	59
4.1.1 Atividade biológica e modelagem molecular de derivados benzimidazólicos, análogos do composto líder 1.....	59
4.1.2 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade dos derivados benzimidazólicos contra o <i>T. cruzi</i> ..	67
4.1.3 Avaliação da pré-toxicidade dos derivados benzimidazólicos em camundongos....	70
4.1.4 Avaliação da toxicidade dos derivados benzimidazólicos em linhagem de células Vero.....	71
4.1.5 Planejamento e ensaios bioquímicos de novos análogos do composto líder 1 – avaliação do benzimidazol.....	72
4.1.6 Planejamento e avaliação bioquímica de novos compostos benzimidazólicos N-substituídos - investigação do efeito da modificação molecular no mecanismo de inibição.....	76
4.1.7 Avaliação da atividade antiparasitária dos derivados N-substituídos benzimidazólicos.....	78
4.1.8 Planejamento e ensaios bioquímicos de derivados do composto líder 1 – avaliação do papel da fenila.....	79
4.1.9 Ensaio de citotoxicidade e determinação do índice de seletividade.....	81
4.2 Estudos farmacocinéticos e de metabolismo.....	83
4.2.1 Determinação <i>in vitro</i> de parâmetros farmacocinéticos para os derivados benzimidazólicos utilizando microsomas de fígado.....	83
4.2.2 Determinação <i>in vivo</i> de parâmetros farmacocinéticos utilizando camundongos....	85
4.2.3 Correlação <i>in vitro</i> x <i>in vivo</i> (IVIVC).....	86
4.2.4 Determinação da estabilidade dos compostos, utilizando-se hepatócitos humanos.	88
4.2.5 Identificação das isoformas da CYP450 envolvidas no metabolismo dos derivados benzimidazólicos.....	89
4.2.6 Identificação dos sítios de metabolismo dos compostos como subsídio para otimização da estabilidade metabólica.....	91
4.2.7 Baixa permeabilidade e ligação dos compostos à proteínas - interpretação da aparente falta de conexão entre valores de IC ₅₀ contra a cruzaina e o <i>T. cruzi</i>	96

4.2.8 Avaliação de um conjunto adicional de moléculas e estudos de SAR para a estabilidade metabólica dos derivados benzimidazólicos.....	97
4.2.9 MPO Score.....	105
4.2.10 Determinação <i>in vivo</i> dos parâmetros farmacocinéticos e correlação IVIVC.....	107
4.3 Composto líder 2 – planejamento e avaliação de derivados de imidas cíclicas.....	110
4.3.1 Avaliação da atividade antiparasitária dos derivados imídicos.....	115
4.3.2 Determinação <i>in vitro</i> de parâmetros farmacocinéticos para os derivados imídicos com microsossomos de fígado.....	116
4.3.3 Identificação dos sítios de metabolismo como subsídio para otimização da estabilidade metabólica dos compostos.....	118
5 CONCLUSÕES.....	119
6 PERSPECTIVAS.....	121
REFERÊNCIAS.....	123

1 INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

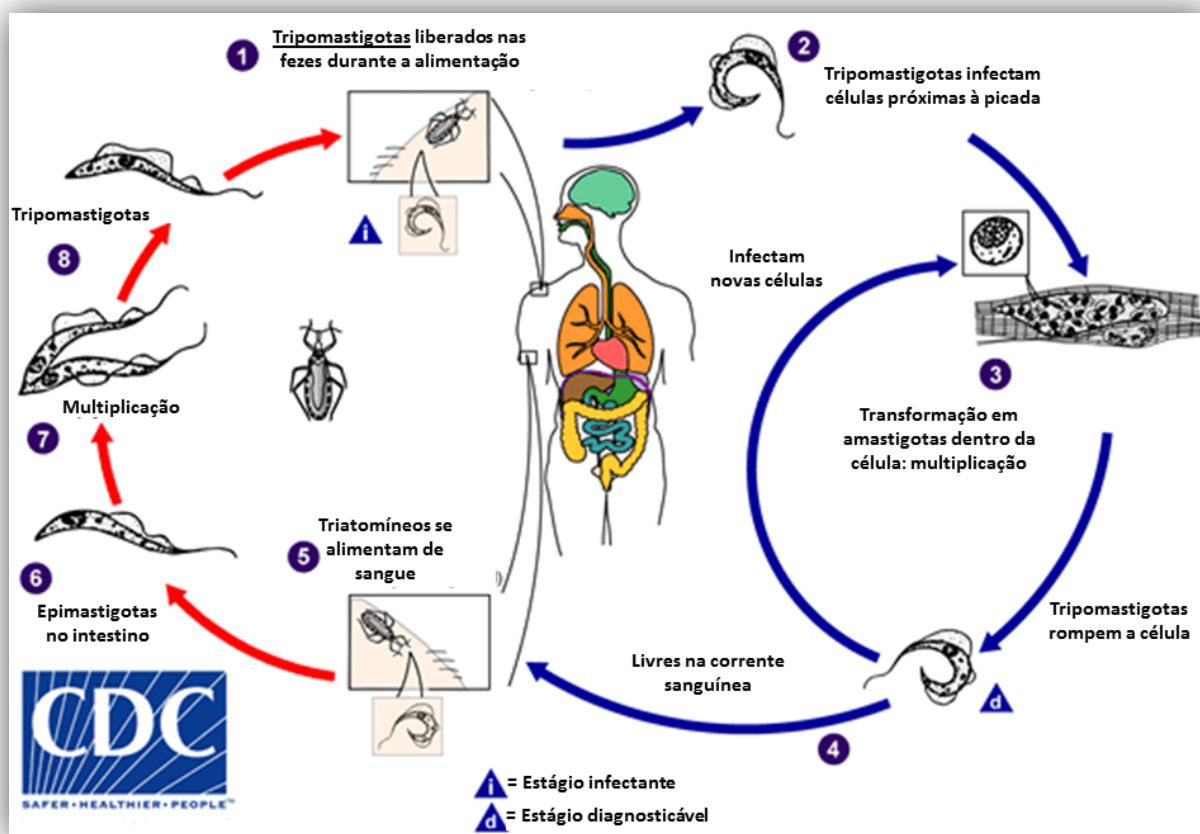


Figura 1 - Ciclo de vida do *T. cruzi*. O inseto triatomíneo, vetor da doença, se alimenta do sangue do hospedeiro e libera tripomastigotas metacíclicos em suas fezes próximo à picada. Os tripomastigotas metacíclicos entram no organismo do hospedeiro pela picada ou por meio de membranas mucosas intactas como a conjuntiva (1). Espécies de triatomíneos que atuam como vetores da doença de Chagas pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem as células próximas ao sítio de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas (2). As amastigotas se multiplicam por fissão binária (3), se diferenciam em tripomastigotas e são liberados na circulação sanguínea. Os tripomastigotas infectam células de vários tecidos e se transformam em amastigotas intracelulares em novos sítios de infecção. Manifestações clínicas podem resultar deste ciclo infectivo. Os tripomastigotas na circulação sanguínea não se multiplicam (diferentemente dos tripanosomas africanos). A multiplicação somente acontece quando os parasitas invadem outras células ou são ingeridos por outro vetor. O triatomíneo é infectado ao se alimentar de sangue humano ou animal contendo parasitas circulantes (5). Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino médio do vetor (6). Lá se multiplicam e se diferenciam (7) em tripomastigotas metacíclicos no intestino grosso (8).

Fonte: Adaptada de *Centers...*¹⁶⁵

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, foi descrita em 1909 pelo médico sanitariano brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, quando identificou o parasita *Trypanosoma cruzi* como agente causador de uma doença febril aguda que afligia brasileiros que trabalhavam na construção de ferrovias no norte do país,¹ nomeando o agente causador da

doença em homenagem ao seu mentor, Oswaldo Cruz.² A doença é uma zoonose transmitida, principalmente, por secreções de insetos triatomíneos infectados pelo *T. cruzi*. Estes insetos – popularmente conhecidos como barbeiros (Brasil), winchuka (Argentina, Bolívia e Chile), *kissing bugs* (em inglês) – atuam como vetores, sendo encontrados nas Américas do Sul e Central, México³ e sul dos Estados Unidos.⁴ As etapas do ciclo de vida do parasita (*Trypanosoma cruzi*), tanto no vetor (*Triatomíneos*) quanto no hospedeiro (mamíferos vertebrados, aqui representados pelo *Homo sapiens*), são ilustradas na **Figura 1**. Há evidências de que os insetos triatomíneos, vetores do parasita, transmitissem o parasita entre animais selvagens nas Américas do Sul e Central por milhões de anos antes de a doença atingir animais domésticos e humanos há mais de 9 mil anos.⁵⁻⁶ Há aproximadamente 200 anos, a rápida conversão da floresta, *habitat* natural do vetor, em campos agrícolas, criou inumeráveis oportunidades para o *T. cruzi* propagar-se entre animais domésticos, tornando a doença de Chagas uma zoonose endêmica.⁷

Ainda hoje, a doença de Chagas continua sendo um problema de saúde grave na América Latina e uma doença emergente em áreas não endêmicas como os Estados Unidos, Canadá, Europa, Japão e Austrália, principalmente pela emigração de indivíduos infectados.⁷⁻⁹ Além disso, pelo menos 7 casos de infecções autóctones foram relatadas e documentadas nos Estados Unidos, onde foram encontrados vetores infectados pelo *T. cruzi*.^{4,10-11} A **Figura 2** ilustra sua distribuição geográfica, de acordo com dados recentes da OMS.

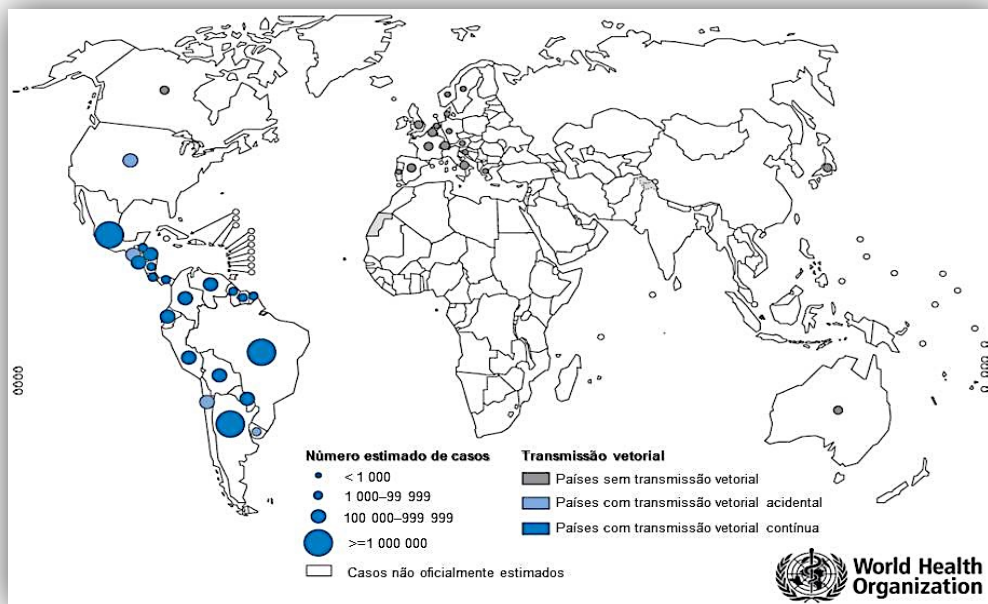


Figura 2 - Distribuição mundial de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, com base em estimativas oficiais da transmissão vetorial, no período de 2006 a 2009.

Fonte: Adaptada de “WORLD...¹¹⁷”

Dentre as pessoas acometidas pela doença de Chagas atualmente, cerca de 20 a 30 % (2 a 3 milhões de pessoas) estão atualmente sofrendo complicações decorrentes da cardiomiopatia chagásica ou irão desenvolver esta sequela, uma condição altamente debilitante, caracterizada por arritmias cardíacas, falha na função cardíaca e risco de morte súbita por fibrilação ventricular, taquicardia ou eventos tromboembólicos.⁹ Outra estimativa sugere que até 5,4 milhões de pessoas desenvolverão cardiomiopatia chagásica.¹²⁻¹³ Danos ao trato gastrointestinal também pode originar condições como megaesôfago e megacolon.⁹ De acordo com um trabalho publicado no ano de 2012 em uma conceituada revista na área de doenças negligenciadas, há inúmeras semelhanças entre a doença de Chagas no continente americano e a epidemia da HIV/AIDS, principalmente nas duas primeiras décadas após sua descoberta,¹⁴ um alerta para a sua gravidade, que pode estar sendo subestimada.

Por ser uma das principais causas de insuficiência cardíaca nos países em desenvolvimento,⁷ resultando em um grande impacto econômico e social e, pelo investimento irrisório no desenvolvimento de novos fármacos, ela é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença tropical negligenciada (DTN) de alta prioridade em seus programas de pesquisa e desenvolvimento.⁶ A OMS estima que de oito a dez milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica.¹⁵ Contudo, nas últimas décadas, o perfil epidemiológico tem mudado devido aos novos padrões de migração populacional e ao bem sucedido controle de sua transmissão vetorial, levando à urbanização e globalização da doença.¹⁶ Outras formas de transmissão como a congênita, por transfusão sanguínea e doação de órgãos, têm se tornado motivo de preocupação em regiões não-endêmicas, levando países como os Estados Unidos a adotarem como rotina a realização de testes para a presença de anticorpos contra o parasita no sangue doado aos seus bancos de sangue. As fases clínicas de manifestação da doença se dividem em aguda e crônica e são ilustradas esquematicamente na **Figura 3**.

Na fase aguda, sintomas como febre, desconforto, edema facial, linfadenopatia generalizada e hepatosplenomegalia são comuns, desaparecendo espontaneamente entre quatro a seis semanas. A fase crônica pode ser assintomática (indeterminada) ou sintomática (determinada). Quando assintomática, os pacientes podem transmitir o parasita para outras pessoas sem apresentar sinais de enfermidade. Esta fase pode durar dezenas de anos. Frequentemente, a doença é descoberta na fase crônica sintomática, caracterizada pelo crescimento e conseqüente prejuízo da função de órgãos do sistema digestivo ou do coração. A cardiomiopatia chagásica é a manifestação clínica mais importante e severa na fase crônica

da doença de Chagas, sendo caracterizada por insuficiência cardíaca, arritmias ventriculares, fenômenos tromboembólicos e morte súbita.¹⁷

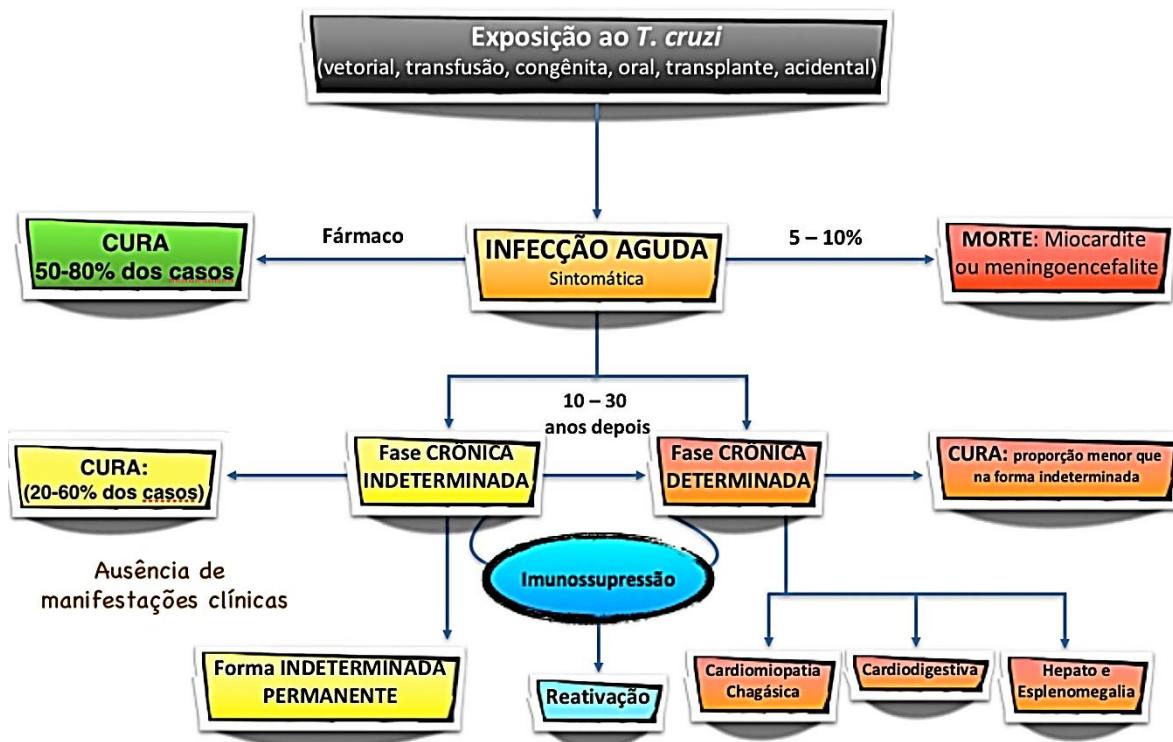


Figura 3 - Duas fases clínicas de manifestação da doença de Chagas. A primeira, conhecida como fase aguda e, a segunda, como fase crônica.
Fonte: Elaborada pela autora.

Além de ser prevalente na América Latina e em vários outros países desenvolvidos e, de sua relevância clínica e epidemiológica, a doença de Chagas também se torna importante no setor econômico. A mortalidade precoce e a incapacidade significativa causadas por esta doença, que muitas vezes afeta a população de adultos jovens, resultam em um grande impacto econômico e social, incluindo o desemprego e a diminuição da capacidade produtiva.^{18,19} Economicamente, o custo anual da doença de Chagas é contabilizado em mais de US\$7 bilhões. Somente no Brasil, mais de US\$ 1,3 bilhão em salários e produtividade industrial são perdidos devido a trabalhadores afetados pela doença.^{8,19} De acordo com outra métrica que contabiliza as perdas em produtividade (DALYs, do inglês para *disability-adjusted life-years*), somente na América Latina, de acordo com dados de 2008, o custo estimado foi de 662 mil DALYs, cerca de 6 vezes superior à malária.¹⁴

Apesar de a doença ter sido descrita há mais de cem anos, a farmacoterapia ainda é extremamente insatisfatória.²⁰ Os fármacos disponíveis, benzonidazol (Rochagan[®], da Roche) e nifurtimox (Lampit[®], da Bayer), desenvolvidos na década de 1970, são extremamente limitados²¹ e apresentam problemas sérios como: i) eficácia moderada (60-80% de cura) na fase aguda da doença; (ii) baixa eficácia na fase crônica da doença; (iii) variações regionais na eficácia devido a cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes aos fármacos; (iv) efeitos adversos graves, tais como distúrbios digestivos, desordens hematológicas (nifurtimox) e dermatite hipersensitiva (benzonidazol); (v) baixa aderência dos pacientes ao tratamento devido aos efeitos adversos que surgem com o tempo; (vi) longo período de tratamento (30-90 dias); (vii) ausência de doses pediátricas; (viii) contraindicação na gravidez; (ix) necessidade de monitoramento médico especializado.²² A toxicidade do nifurtimox causou a sua retirada do mercado brasileiro, tornando o benzonidazol a única alternativa terapêutica disponível. Contudo, a sua produção tem sido bastante restrita, colocando em risco a sua disponibilidade para os próximos anos.

Todos esses fatos evidenciam que a falta de tratamentos efetivos para a doença de Chagas cria uma lacuna na tentativa de atenuar o sofrimento de um número significativo de indivíduos afetados. Consequentemente, a busca por novos agentes quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos se torna indispensável. As proteases são alvos biológicos de grande importância na clínica médica. Entre elas, destaca-se a enzima cruzaina, principal cisteíno-protease do *T. cruzi* e alvo terapêutico validado para o desenvolvimento de novas terapias antichagásicas.

1.2 Proteases

Proteases, peptidases ou enzimas proteolíticas possuem a função de catalisar a degradação de ligações peptídicas. Em protozoários como o *T. cruzi*, as proteases possuem múltiplas funções que envolvem desde a invasão celular até a evasão do parasita do sistema imune do hospedeiro.²³ As proteases podem ser divididas de acordo com o tipo de reação que promovem, sendo classificadas como exopeptidases, quando removem resíduos de aminoácidos das extremidades N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) e, como endopeptidases, quando são responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações peptídicas internas. Outro critério utilizado para classificar as proteases está relacionado com o seu mecanismo catalítico de clivagem, agrupando-as em seis classes

principais: serino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil-proteases, metaloproteases, treonino-proteases e glutamato-proteases.²⁴

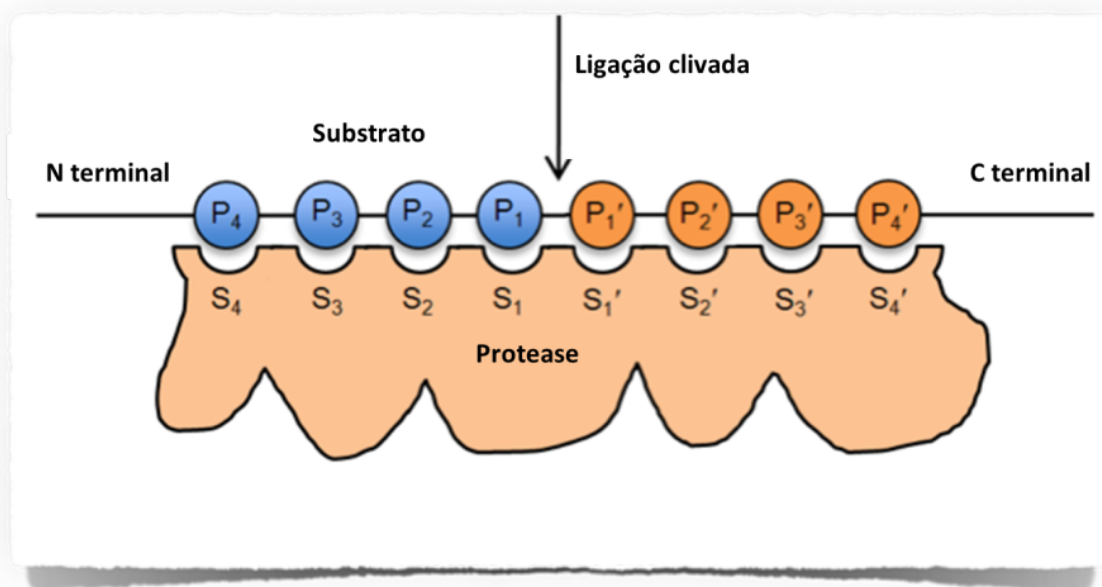


Figura 4 - Modelo de interação enzima-substrato para proteases. Nesse modelo os subsítios da enzima são representados pela letra “S” e os peptídeos do substrato pela letra “P”. O sítio de clivagem do substrato está identificado por uma seta.

Fonte: Adaptada de TURK.²⁵

As proteases possuem cavidades em suas estruturas denominadas subsítios. Um modelo foi desenvolvido para descrevê-los, onde os subsítios da enzima, representados pela letra “S”, são os locais em que se ligam os resíduos de aminoácido do substrato, representados pela letra “P”. Esses subsítios são numerados de S1 a Sn seguindo a direção N-terminal do substrato e de S1’ a Sn’ seguindo a direção C-terminal. Os resíduos do substrato acomodados nesses subsítios são numerados de P1 a Pn se direcionados ao N-terminal e de P1’ a Pn’ se direcionados ao C-terminal da ligação peptídica do substrato que funciona como sítio de clivagem²⁶ (**Figura 4**).

1.3 Cruzaína

A cruzaína (EC 3.4.22.51) é a principal e mais abundante cisteíno protease do *T. cruzi*. Expressa em todas as etapas do ciclo de vida do parasita (**Figura 1**), ela é fundamental para a sua nutrição, desenvolvimento, evasão do sistema imune e invasão celular do hospedeiro. Devido à sua importância biológica, a enzima é essencial para a sobrevivência do *T. cruzi*,²⁷

sendo considerada um alvo molecular validado para o desenvolvimento de novos medicamentos contra a doença de Chagas.²⁸⁻²⁹

Estruturas tridimensionais (3D) da cruzaina em complexo com uma grande variedade de ligantes estão disponíveis no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês, *Protein Data Bank*).³⁰⁻³⁷ A resolução destas estruturas permitiu o entendimento da proteína em nível atômico, levando à identificação e localização de regiões importantes e comumente encontradas em cisteíno-proteases: a tríade catalítica, a cavidade para oxiânion (do inglês, *oxyanion hole*) e o bolsão de especificidade.

Pertencente à família da papaína, a cruzaina tem estrutura formada por dois domínios, um deles composto predominantemente de hélices- α e o outro de extensas interações entre fitas- β antiparalelas (**Figura 5A**). O sítio ativo se encontra na interface entre os dois domínios, onde estão presentes os resíduos de aminoácido Cys25, His162 e Asn182 (**Figura 5B**), que compõem a chamada tríade catalítica.³⁸

Este sítio catalítico é dividido em quatro subsítios principais, denominados S1, S2, S3 e S1' (**Figura 6**). O subsítio S2 é o principal responsável pela especificidade da enzima pelo substrato. Pouco exposto ao solvente, é delimitado pelas cadeias laterais dos resíduos hidrofóbicos Met68, Ala138, Leu160 e Gly163 (**Figura 5B**), o que lhe confere especificidade por grupos hidrofóbicos. A especificidade enzimática das cisteíno-proteases da família da papaína depende primariamente das interações P2/S2 (**Figura 4**). A análise da estrutura tridimensional da cruzaina covalentemente ligada ao substrato Z-Phe-Ala-FMK revelou que o subsítio S2 da cruzaina apresenta algumas particularidades com relação ao arquétipo da papaína.³⁹

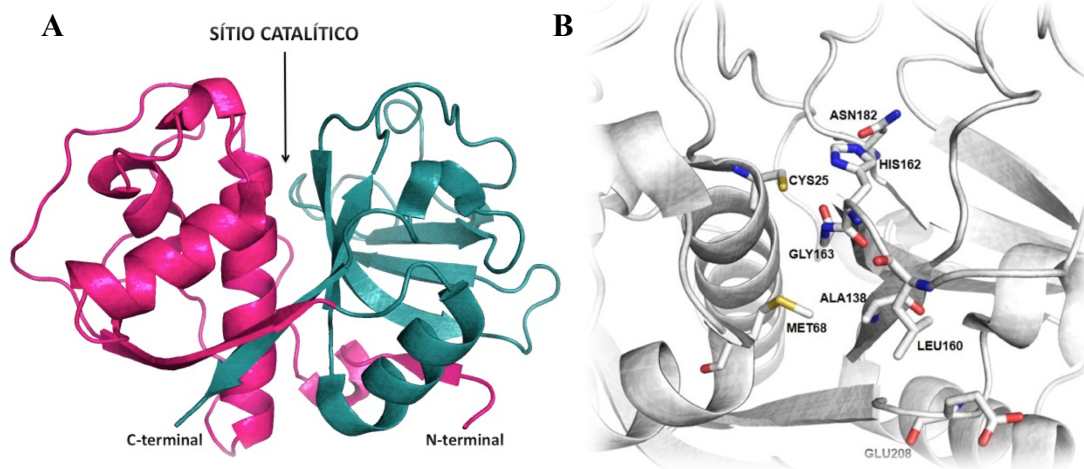


Figura 5 - Estrutura 3D da cruzaina. **A)** Estrutura da cruzaina formada por dois domínios. Em rosa, o domínio constituído predominantemente por hélices- α e, em verde, o domínio composto principalmente por fitas- β antiparalelas. **B)** Aminoácidos que compõem o sítio ativo da cruzaina.

Fonte: Elaborada pela autora.

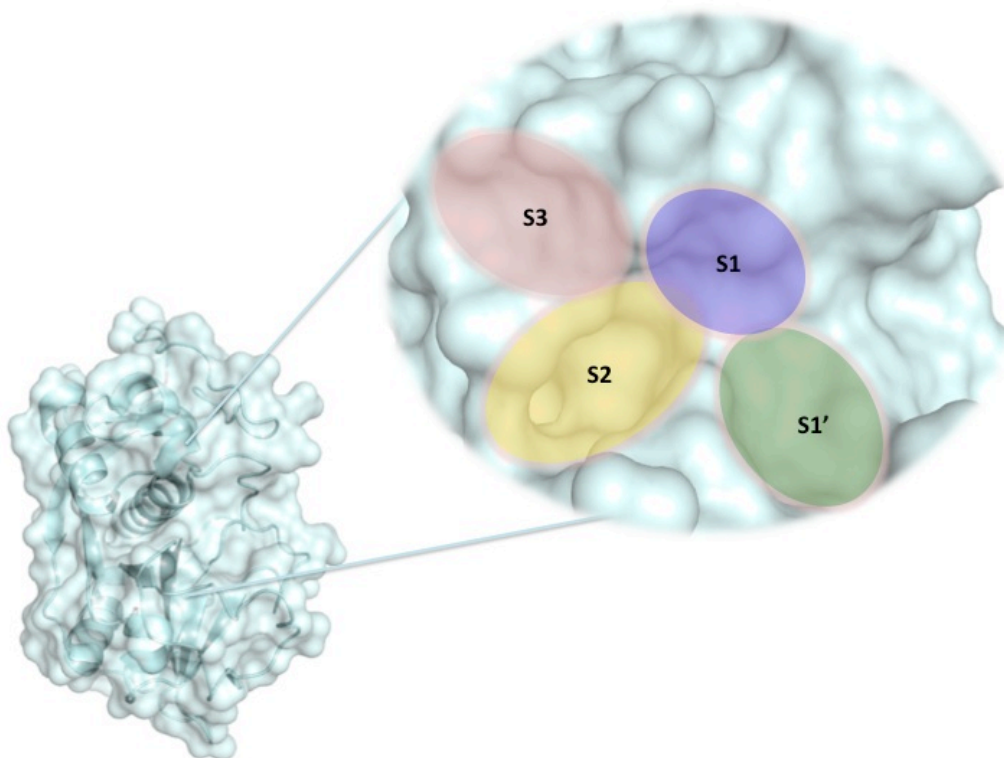


Figura 6 - Sítio de ligação da Cruzaina, onde são destacados seus principais subsítios: S1, S2, S3 e S1'.
Fonte: Elaborada pela autora.

A presença do Glu208 na extremidade do subsítio S2 (**Figura 7**) lhe atribui uma característica ácida, possibilitando, além do reconhecimento de substratos contendo grupos hidrofóbicos na posição P2, interações com grupos carregados positivamente.³⁴

Além da carga negativa, o Glu208 contribui conferindo flexibilidade ao S2, possibilitando a acomodação de substratos mais ou menos volumosos. A flexibilidade deste resíduo pode ser claramente observada quando sobrepomos três estruturas cristalográficas: 3IUT, 1F29 e 3KKU (**Figura 7**). O que torna a presença do Glu208 neste sítio ainda mais especial é o fato de que ele é o principal responsável por diferenciar a cruzaina de outras proteases, dentre elas as humanas.

Em termos de especificidade enzimática, a presença deste aminoácido é responsável pelo reconhecimento de Arg e Phe em P2 pelas enzimas catepsina B e cruzaina.^{34,40} A preferência da cruzaina por ambos foi determinada e a razão k_{cat}/K_m foi de 90 para Phe em comparação com a Arg. Já para a papaína, o subsítio S2 apresenta uma preferência clara por Phe (razão k_{cat}/K_m para Phe/Arg = 904). Além disso, os resíduos interagentes diferem entre a cruzaina e a papaína e o dobro de contatos de van der Waals são observados entre a papaína e

a Phe, indicando que o sítio da papaína se adequa melhor a este aminoácido. Isso faz sentido, já que a cruzaina é capaz de acomodar Arg e Phe em P2.³⁹

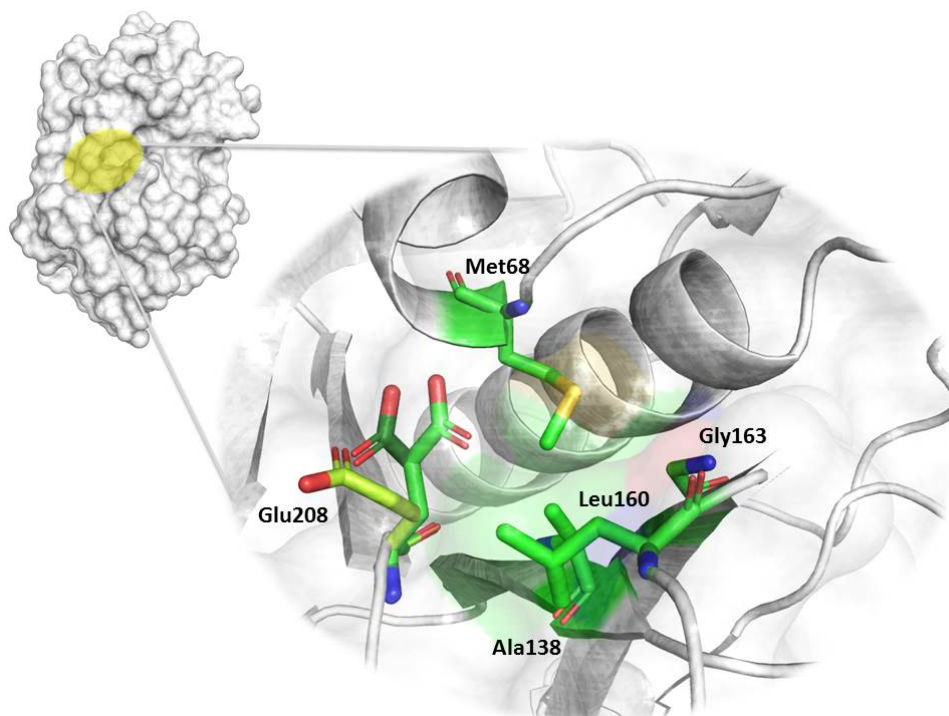


Figura 7 - Subsítio S2 da cruzaina, com destaque para a sua composição hidrofóbica e a flexibilidade do Glu208. As coordenadas para as diferentes conformações do Glu208 foram obtidas a partir de três estruturas cristalográficas disponíveis no PDB. A conformação mais aberta, com a cadeia lateral em direção ao solvente, foi obtida da estrutura 3IUT (verde limão). A conformação intermediária foi obtida da estrutura 1F29 (verde escuro) e a conformação mais fechada da estrutura 3KKU (verde claro).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os subsítios S1', S1 e S3 são menos definidos e mais expostos ao solvente, porém são formados por resíduos importantes para o reconhecimento e posicionamento de ligantes. O subsítio S1 abriga o resíduo catalítico Cys25, e os resíduos Gln19, Gly23, Ser64 e Leu67. No S1' encontramos os outros dois aminoácidos que compõe a tríade catalítica, His162 e Asn182, além do Asp161 e Trp184. Finalmente, o subsítio S3 é composto pelos aminoácidos Ser61, Ser64, Gly65, Gly66 e Leu67.

1.4 Planejamento de inibidores da cruzaina

Inibidores da cruzaina são capazes de matar o *T. cruzi* e curar animais infectados pela doença de Chagas, validando esta enzima como um alvo promissor para o planejamento de novos fármacos.^{28,41-44} Além disso, um estudo genealógico comparando a enzima presente em

diferentes DTUs (*Discrete Typing Units*, ou seja variantes genéticas do *T. cruzi*)⁴⁵ demonstrou que os seus subsítios são altamente conservados em todas elas, corroborando a cruzaina como alvo valioso para o planejamento de fármacos, vacinas, diagnóstico e abordagens genótípicas.⁴⁶ Estudos utilizando a cruzaina como antígeno para o desenvolvimento de vacinas estão em andamento e demonstram resultados animadores.⁴⁷

O planejamento de inibidores da cruzaina se beneficiou inicialmente de estudos bioquímicos caracterizando seus substratos de preferência, a partir de coleções de peptídeos.^{48,49} Consequentemente, as primeiras classes de inibidores desenvolvidos foram peptídicos e se ligam de forma covalente e irreversível, como as vinilsulfonas e as fluorometilcetonas. Dentre estas, se destaca a vinilsulfona K777 (**Figura 8**), que mostrou eficácia contra culturas celulares de parasitas⁵⁰ e em modelos experimentais da doença em camundongos²⁹ e cães.⁵¹

A determinação da estrutura cristalográfica da cruzaina associada com um inibidor³⁹ abriu caminho para a aplicação de técnicas de planejamento de fármacos baseado em estruturas, ou SBDD (do inglês, *Structure Based Drug Design*). Estruturas adicionais permitiram entender aspectos funcionais e estruturais dessa enzima, como a capacidade de clivar peptídios contendo resíduos hidrofóbicos e positivos em S2,⁵² subsítio de maior importância para a especificidade de cisteíno-proteases. Posteriormente, várias estruturas associadas com diversas classes de inibidores foram determinadas, permitindo avaliar a flexibilidade dos resíduos do sítio ativo e as interações comuns entre esses ligantes e a enzima, fornecendo assim uma base sólida para a aplicação de métodos de SBDD. Atualmente, 25 estruturas cristalográficas da cruzaina, todas associadas com inibidores, estão disponíveis no PDB.

Como resultado desse trabalho estrutural, uma série de inibidores da cruzaina foi identificada por meio da aplicação de estratégias computacionais e experimentais de química medicinal. São exemplos importantes o uso de técnicas de QSAR (do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationships*),^{53,54} o desenvolvimento de inibidores a partir de coleções de substratos,⁵⁵ a otimização de inibidores obtidos por técnicas de HTS e de SBVS (do inglês, *High-Throughput Screening*³⁷ e *Structure-Based Virtual Screening*,^{33,56} respectivamente). O emprego desses métodos permitiu, além do desenvolvimento dos tradicionais inibidores peptídicos irreversíveis para proteases, a descoberta de inibidores potentes, peptidomiméticos^{30,34,35} e não covalentes,³³ para a cruzaina (**Figura 8**).

A estratégia de inibição de cisteíno-proteases como alvos terapêuticos mostrou sua importância recentemente com o candidato à fármaco odanacatib (**Figura 8**). Esse derivado

bisfenil-metilsufonila demonstrou alta eficácia e bom perfil de segurança em estudos clínicos de fase III.⁵⁷ O uso do odanacatib, um inibidor da catepsina K,⁵⁸ enzima envolvida na reabsorção óssea,⁵⁹ está sendo investigado para o tratamento da osteoporose e metástase óssea. Este candidato está sendo desenvolvido pela empresa farmacêutica Merck & Co e foi encaminhado para aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em 2015.

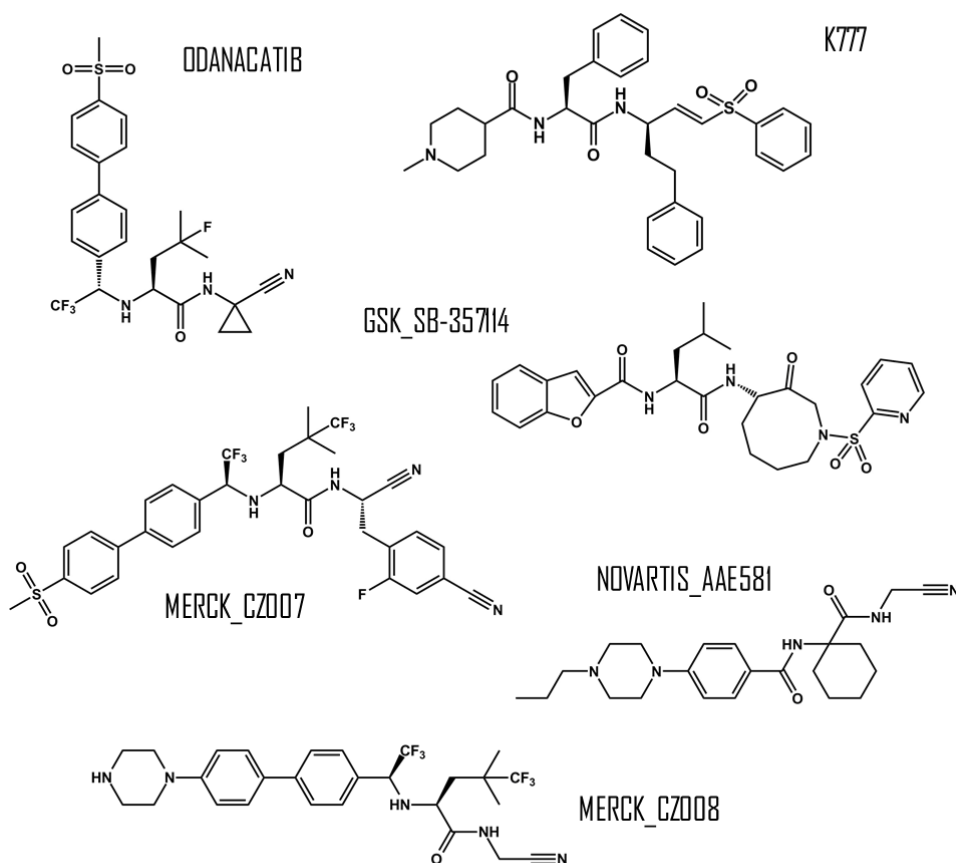


Figura 8 - Odanacatib, K777 e outros exemplos de classes de inibidores da cruzaina.
 Fonte: Adaptada de MARTINEZ-MAYORGA et al.⁴⁹

1.5 Otimização de candidatos a fármacos por estratégias de SBDD e LBDD

A descoberta de fármacos é fortemente guiada pela utilização combinada e sinérgica de ferramentas experimentais e computacionais. Neste contexto, integrar de forma racional e objetiva, abordagens que permitam a identificação de *hits* e a otimização de compostos líderes, bem como a descoberta de novas entidades químicas (NCEs do termo em inglês *New Chemical Entities*), é um dos maiores desafios.⁶⁰

A utilização de metodologias de SBDD e LBDD (*Ligand Based Drug Design*) é bastante atrativa e tem sido amplamente explorada na academia e na indústria, com resultados promissores. De maneira geral, a escolha entre o uso dessas metodologias (SBDD, LBDD ou de uma combinação SBDD e LBDD) depende da natureza, quantidade e qualidade da informação molecular disponível para o problema em questão. As abordagens de LBDD são úteis quando há apenas informações sobre a pequena molécula (estrutura e atividade, por exemplo). Em contrapartida, métodos de SBDD se baseiam na incorporação de informação estrutural sobre o receptor ao qual uma dada molécula se liga. É importante ressaltar ainda que, quando ambas informações são disponíveis, essas abordagens podem ser exploradas de forma combinada, criando novas oportunidades para inovação em química medicinal.

Uma vez selecionados ligantes bioativos para uma determinada proteína alvo, torna-se de grande interesse a determinação de estruturas de complexos do tipo proteína-ligante que permitam a avaliação de suas interações em nível atômico. Uma vez determinadas, essas interações podem ser otimizadas com o objetivo de melhorar propriedades como potência, afinidade e seletividade. A aplicação de métodos de SBDD tem um rico histórico, com novos exemplos sendo descritos constantemente, explorando uma diversidade de estratégias de química medicinal através da integração de métodos experimentais e computacionais.⁶¹⁻⁶³ Um exemplo importante é o fármaco imatinib (Gleevec[®], da Novartis), um inibidor da enzima tirosina quinase BCR-ABL, empregado no tratamento da leucemia. Além do papel fundamental desempenhado pelos métodos SBDD nos estágios iniciais de desenvolvimento deste fármaco, com o surgimento de resistência ao tratamento clínico, mutações específicas em proteínas de cepas resistentes ao imatinib foram exploradas para a geração de novas classes de inibidores.⁶³

A integração de métodos de SBDD e LBDD tem também proporcionado a identificação de novos ligantes para otimização molecular e desenvolvimento de compostos líderes. Nesses casos, o emprego de informação estrutural (complexos proteína-ligante) é essencial na identificação dos ligantes bioativos iniciais (do inglês, *hits*).⁶⁴ Em um exemplo recente, a combinação do uso de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) e cristalografia em larga escala na triagem de fragmentos permitiu a identificação de *hits* contra a chaperona Hsp90, um alvo molecular para o desenvolvimento de terapias anticâncer. Estratégias de SBDD permitiram a otimização da afinidade desses fragmentos contra o alvo e de propriedades farmacocinéticas, gerando um candidato a fármaco contra o câncer que atualmente se encontra em ensaios clínicos.^{62,65} Outros exemplos recentes ilustram que diversas moléculas desenvolvidas, utilizando SBDD e LBDD, progrediram para a fase de

desenvolvimento clínico, indicando a eficácia da otimização molecular como estratégia para o desenvolvimento de candidatos a fármacos.⁶⁶

1.6 O estudo de propriedades farmacocinéticas e a otimização múltipla de parâmetros

Os últimos 20 anos marcaram uma evolução expressiva das estratégias de identificação de compostos químicos líderes na indústria farmacêutica. Com foco cada vez maior na velocidade e eficiência da síntese química e da triagem biológica, o objetivo durante este período foi a descoberta de pequenas moléculas potentes e seletivas para novos alvos terapêuticos.⁶⁷

A mudança de uma estratégia histórica, baseada na triagem farmacológica *in vivo* em baixa escala, para outra em que o foco são alvos moleculares específicos, selecionados com base no conhecimento sobre a biologia da doença de interesse e com a ajuda das abordagens “ômicas”, não foi capaz de refrear o aumento nos custos ou mesmo de melhorar a taxa de produção e comercialização de NCEs.⁶⁸ Dados indicam que, ainda hoje, de todos os compostos selecionados como candidatos a fármacos, menos de 1% chegarão ao mercado, mostrando que o processo como um todo continua tendo um desempenho muito aquém do ideal.⁶⁹⁻⁷⁰

Com o objetivo de gerar candidatos a fármacos de forma mais efetiva, a indústria farmacêutica está trabalhando de maneira a integrar estratégias de triagem inicial, como a determinação da potência de uma molécula contra um alvo específico, com a determinação de propriedades farmacocinéticas *in vitro*. Há um esforço muito grande para que ambos os resultados sejam fornecidos concomitantemente para o maior número de moléculas possível, munindo seus pesquisadores de informações essenciais para que a escolha da molécula ideal seja feita de forma acertada. Como resultado final, o atual processo de descoberta de fármacos favorece moléculas candidatas que possuam elevada potência *in vitro* para um alvo definido e propriedades farmacocinéticas (ADME: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) adequadas.⁷¹⁻⁷⁴

Um dos benefícios observados para moléculas com alta afinidade *in vitro* é a maior probabilidade de atingirem seus alvos (e conseqüentemente seus efeitos terapêuticos) com a administração de dosagens baixas. Outras vantagens incluem a redução de efeitos de ligação inespecífica com proteínas relacionadas a efeitos tóxicos (e.g.; canal cardíaco de potássio humano clonado, HERG), bem como a toxicidade prolongada e riscos de reações adversas devido a geração de metabólitos reativos.⁷⁵ A alta afinidade para o alvo proposto também

diminui o risco de interações inespecíficas com proteínas muito semelhantes ao alvo terapêutico. Considerando-se que os ensaios que avaliam potência (IC_{50} , EC_{50}) tem uma escalabilidade consideravelmente maior e custos mais baixos por composto, do que os ensaios utilizados para avaliar propriedades de ADME, há uma tendência para que a avaliação da farmacodinâmica tenha usualmente um papel preponderante na seleção e otimização de uma série líder.⁷⁶

Por outro lado, alguns ensaios *in vitro* para a determinação de parâmetros de ADME têm custos e escalas comparáveis àqueles que avaliam a afinidade/potência e podem ser empregados em paralelo. O uso concomitante desses ensaios gera um perfil de atividade mais minucioso e completo, sendo de maior utilidade na tomada de decisões no processo de otimização molecular. De maneira geral, como nem todos os compostos disponíveis em um programa de planejamento de fármacos podem ser avaliados em todos os ensaios, tipicamente, um esquema de triagem pode ser implementado. O filtro inicial geralmente utilizado é a potência do composto contra o alvo molecular.⁷⁷

A considerável complexidade envolvida na otimização de propriedades de ADME torna a otimização de candidatos a novos fármacos muito desafiadora. Uma questão chave é a combinação entre as características necessárias para administração de um fármaco por via oral com as propriedades requeridas para que o princípio ativo seja eficaz contra o alvo estabelecido. Embora a ligação efetiva de moléculas aos alvos relacionados com uma determinada condição médica seja imprescindível, é preciso considerar o nível de potência *in vitro* e seletividade necessária para eficácia. Buscando entender melhor esta relação, Gleeson *et al.* (2011)⁶⁸ analisaram os compostos disponíveis no banco de dados ChEMBL, que inclui mais de 500.000 moléculas disponíveis comercialmente e/ou provenientes de projetos de descobrimento de fármacos. Os principais resultados indicam: i) que fármacos administrados oralmente raramente possuem potência na faixa de nanomolar; ii) que a maioria desses fármacos possui considerável atividade *off-target*, ou seja, não são seletivos; iii) que a potência *in vitro* não tem uma forte correlação com a dose terapêutica. Esses resultados sugerem que o benefício observado para alta potência *in vitro* pode estar sendo compensado por propriedades farmacocinéticas desfavoráveis.

O processo de descoberta de fármacos com foco na avaliação do potencial terapêutico das moléculas, considerando de forma mais completa os parâmetros biológicos necessários para sua atividade *in vivo*, terá maior potencial de sucesso. Dessa maneira, a utilização de abordagens guiadas por valores farmacocinéticos e farmacodinâmicos⁷⁸ é indispensável para melhorar as chances de se encontrar bons candidatos para desenvolvimento clínico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver inibidores da enzima cruzaina de *T. cruzi*, alvo terapêutico validado para a doença de Chagas, utilizando de forma integrada, estratégias experimentais e computacionais de química medicinal e planejamento de fármacos.

2.2 Objetivos específicos

- ✎ Planejar novos inibidores da cruzaina com base em compostos líderes previamente identificados, empregando métodos de SBDD e LBDD;
- ✎ Propor a síntese de compostos planejados;
- ✎ Determinar a potência biológica e afinidade de novos compostos contra a cruzaina;
- ✎ Determinar o mecanismo de ação dos inibidores contra a enzima alvo;
- ✎ Realizar estudos estruturais *in silico* para determinar as interações proteína-inibidor e racionalizar os resultados experimentais;
- ✎ Discutir as relações entre a estrutura e atividade;
- ✎ Avaliar *in vitro* os inibidores mais promissores contra o *T. cruzi*;
- ✎ Avaliar o perfil farmacocinético de compostos selecionados por meio de uma parceria com a empresa farmacêutica norte-americana AbbVie;
- ✎ Discutir as relações entre a estrutura e propriedades de ADME.

3 METODOLOGIA

O emprego de estratégias de SBDD e LBDD exige uma abordagem multidisciplinar, envolvendo a integração de estratégias computacionais e experimentais.

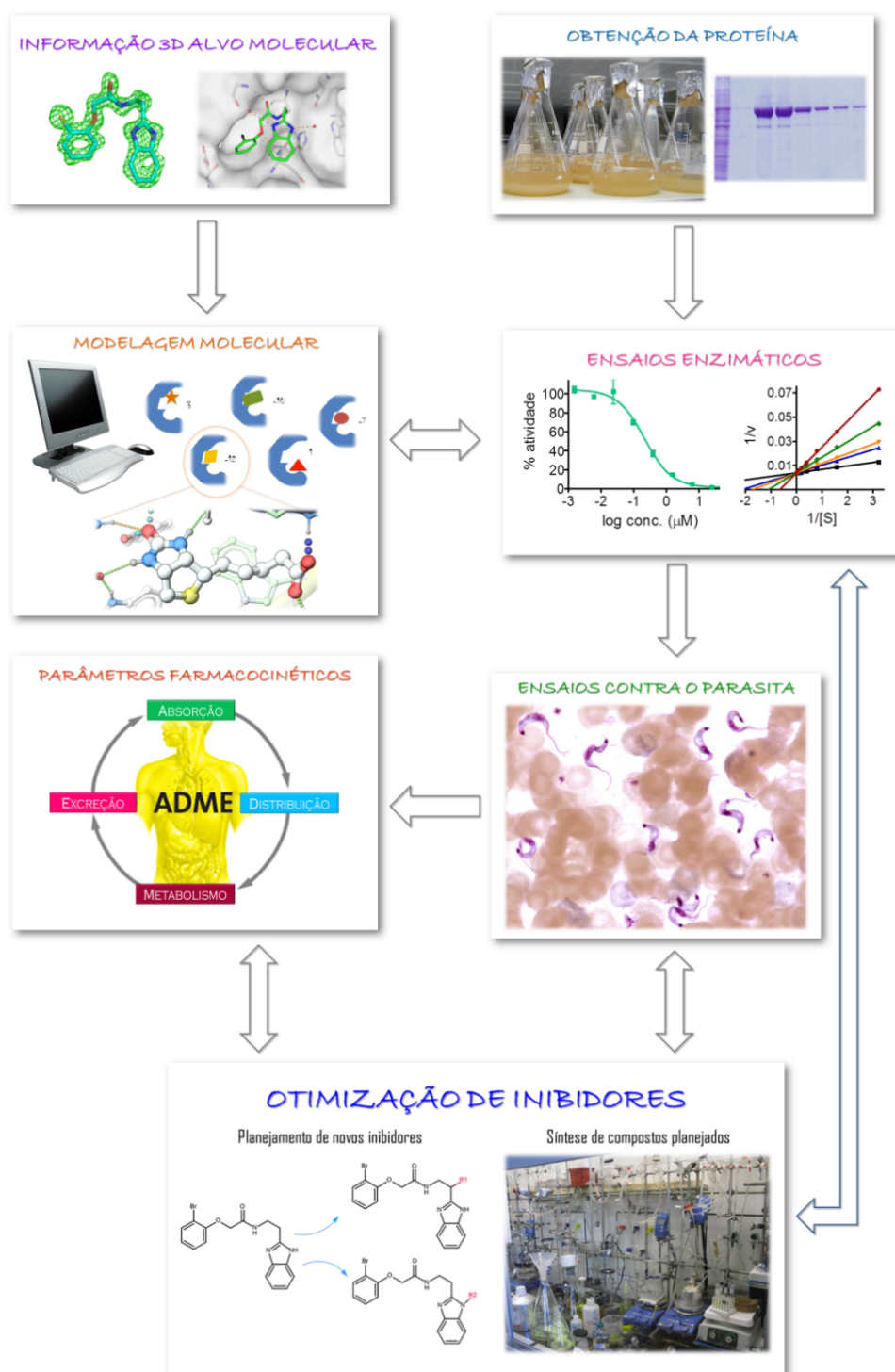


Figura 9 - Integração das metodologias utilizadas nesse trabalho de tese de doutorado.
Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as diversas combinações possíveis, nesse trabalho utilizamos desde a modelagem molecular *in silico*, passando pelo uso da biologia molecular e celular, bioquímica, até os estudos farmacocinéticos *in vivo*. A maneira como as diferentes metodologias foram utilizadas e se relacionam está esquematizada na **Figura 9**.

3.1 Planejamento de inibidores da cruzaina de *T. cruzi*

Neste trabalho, o planejamento e otimização molecular de inibidores da enzima cruzaina de *T. cruzi* se deu a partir de dois inibidores da enzima descritos recentemente na literatura³³ (**Figura 10**). Estes compostos, denominados de **1** e **2**, foram escolhidos como os compostos líderes deste trabalho por apresentarem afinidade pela cruzaina na faixa de baixo μM , representarem duas classes químicas distintas, inibirem a enzima de forma reversível, competitiva e não-covalentes. Ambos foram sintetizados novamente e reavaliados detalhadamente contra a enzima alvo. O mecanismo de inibição reversível competitivo foi confirmado nos dois casos (com as seguintes constantes de inibição, $K_i = 2,0 \mu\text{M}$ e $K_i = 0,8 \mu\text{M}$, respectivamente).

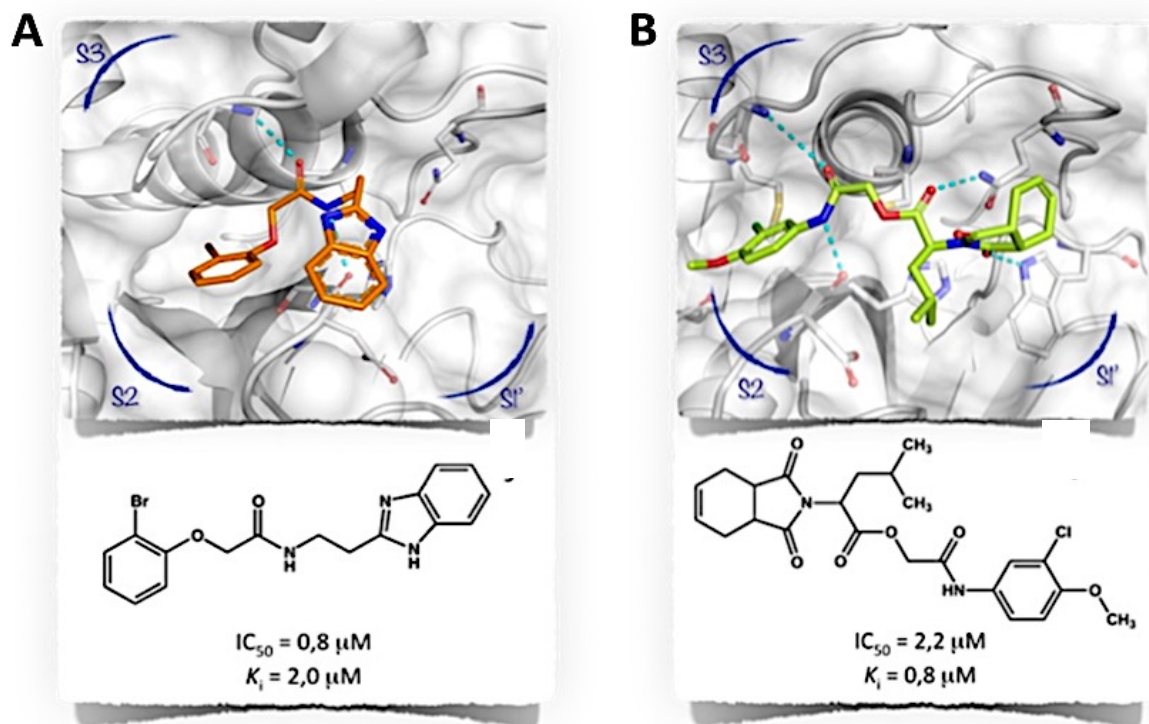


Figura 10 - Modo de ligação intermolecular no sítio ativo, estrutura química e afinidade dos inibidores competitivos da cruzaina, compostos líderes deste trabalho. **A) Primeiro composto líder (1)**, com modo de ligação determinado por cristalografia de raios-X (PDB: 3KKU). **B) Segundo composto líder (2)**, com modo de ligação predito pelo programa de docagem molecular GOLD.⁷⁹

Fonte: Elaborada pela autora.

3.2 Síntese de derivados dos compostos líderes 1 e 2

Todas as moléculas planejadas e avaliadas nesse trabalho foram sintetizadas no Laboratório de Química Orgânica Sintética, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, sob supervisão do Prof. Dr. Luiz Carlos Dias. As moléculas derivadas do **composto 1** foram sintetizadas pelos pós-doutorandos Marco Aurélio Dessoay, Brian Slafer e Celso Oliveira Rezende Junior. As moléculas derivadas do **composto 2** foram sintetizadas pelo doutorando Thiago Stevanatto Sampaio e pelo mestrando Rafael Ferreira.

3.3 Expressão da cruzaina de *T. cruzi*

Para a realização dos experimentos de cinética enzimática apresentados nesse trabalho, foi indispensável a obtenção da cruzaina em sua forma pura e ativa. Para isto, o vetor pQE30 (QIAGEN) contendo a construção gênica que codifica a cruzaina, gentilmente cedido pela Prof. Dra. Ana Paula Cabral de Araújo Lima, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, foi transformado em células de *Escherichia coli*, linhagem M15. Essa construção contém as regiões que codificam o pró-domínio e a região central da enzima, mas é truncada na extensão C-terminal, pois esta possui resíduos que não são essenciais para a atividade enzimática.⁵² Além disso, o plasmídeo permite a expressão da proteína em fusão com uma cauda de histidina, possibilitando sua purificação pelo uso de uma resina de afinidade.

Para a expressão da cruzaina, células de *E. Coli* (linhagem M15) contendo o vetor pQE30 e a sequência codificante da cruzaina, foram pré-inoculadas em 5 mL de meio de cultivo LB (Luria Bertani) contendo 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de kanamicina e cultivadas *overnight* a 37°C, sob agitação leve (200 rpm). No dia seguinte, esta cultura foi adicionada a 1 L de meio LB suplementado com 0,5 M de NaCl, 0,2% de glucose, 1 mM de betaína, 0,5 M de sorbitol, além dos 100 µg/mL de ampicilina e 50 µg/mL de kanamicina. Esta nova cultura foi cultivada a 37°C, 200 rpm, até atingir a D.O.₆₀₀ de 0,9. Em seguida, a cultura foi submetida a um aumento de temperatura, 47°C, 200 rpm, por 20 min, afim de induzir a produção de chaperonas, enzimas que auxiliam no enovelamento correto de proteínas. Logo após, a expressão da cruzaina foi induzida pela adição de 0,2 mM (concentração final) de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo) e permaneceu sob agitação (200 rpm) *overnight* a 20°C.

3.4 Purificação da cruzaina de *T. cruzi*

A purificação deu-se a partir da expressão da cruzaina em 1 L de meio de cultura. Após a expressão, conforme descrito no item 3.3, as células foram centrifugadas e o *pellet* (8,8 g/L) ressuspense em tampão de lise (300 mM NaCl; 50 mM Tris; 1,6 mg/mL de lisozima; pH 8,0), numa proporção de 50 mL para cada 1 L de expressão. Essa mistura foi lisada utilizando-se um sonicador (pulsar *ON*: 30 s; pulsar *OFF*: 45 s; total de 12 pulsos). Após, centrifugamos a mistura lisada a 9000 rpm por 30 min a 4°C.

A cruzaina contida no sobrenadante foi precipitada pela adição de 35% de sulfato de amônio e rotação leve por 2 h a 10°C. Em seguida, esta mistura foi submetida a centrifugação a 9000 rpm por 30 min a 4°C. A análise por gel de SDS indicou que a cruzaina estava no *pellet* formado. Em seguida, a amostra foi dialisada *overnight* a 10°C em tampão de lise, sem sulfato de amônio, para a retirada completa deste componente.

O processo de purificação foi realizado em coluna de bancada utilizando-se resina de níquel (NiNTA superflow – Qiagen). A amostra filtrada foi adicionada à resina previamente lavada e equilibrada com tampão de lise. Afim de otimizar a interação da enzima com a resina, a mistura ficou sob rotação leve por 3 h a 10°C. Após, a amostra foi eluída numa coluna de bancada e o *void* coletado. A coluna foi inicialmente lavada com 500 mL de tampão de lavagem suplementado com imidazol (300 mM NaCl; 50 mM Tris; 10 mM imidazol; pH 8,0). A eluição da cruzaina ocorreu pela utilização deste tampão de lavagem acrescido de um gradiente crescente de imidazol (25, 50, 75, 100 e 250 mM, respectivamente). Alíquotas de 8 mL para cada concentração de imidazol (divididas em 2 amostras de 4 mL cada), foram coletadas e uma amostra de cada uma destas eluições foi utilizada para verificação da presença da enzima em gel de SDS PAGE 12% (**Figura 11**). As eluições de 75 mM I a 250 mM II, continham a proteína e foram misturadas. A fração total foi dialisada em 1,5 L de tampão de acetato 0,1 M e pH 5,5 para retirada do imidazol. Após a diálise, a amostra foi concentrada em um volume final de 4,5 mL.

A etapa seguinte consistiu na clivagem da porção N-terminal da enzima e foi necessária para promover a sua ativação, uma vez que a enzima é expressa como um zimogênio e esta porção “bloqueia” seu sítio ativo. Este é um processo de auto-ativação, pelo qual a cruzaina é capaz de promover a auto-proteólise deste fragmento em meio ácido. Para isto, adicionamos o tampão de ativação (100 mM acetato de sódio; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 10 mM DTT; pH 5,5) numa proporção de 1:1 à amostra resultante da purificação na resina de afinidade. O aumento da atividade da proteína foi monitorado por fluorimetria pela

detecção da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC desde o tempo zero, em intervalos de 1 h ou de 30 min após alguma atividade ter sido detectada (ensaio fluorimétrico para detecção da atividade enzimática descrito detalhadamente no item 3.5 desta tese). A ativação também foi verificada em gel de SDS PAGE 12%, pela verificação da diminuição do peso molecular da enzima devido a perda da porção N-terminal.

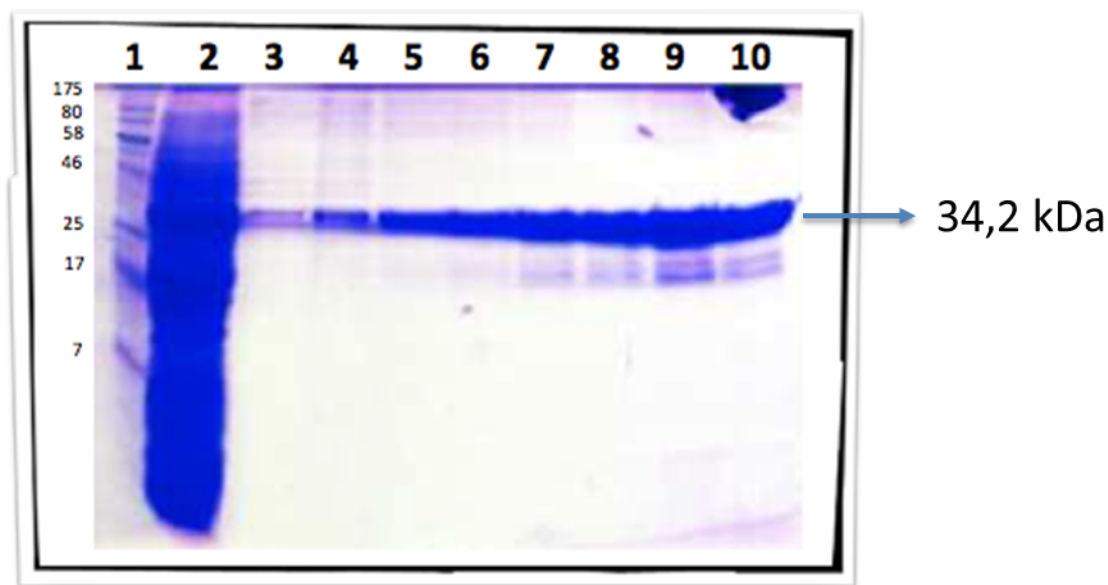


Figura 11 - Gel SDS PAGE 12% das amostras da primeira etapa da purificação da cruzaina em resina de afinidade. (1) Marcador; (2) Expressão induzido; (3) Eluição 50 mM I; (4) Eluição 50 mM II; (5) Eluição 75 mM I; (6) Eluição 75 mM II; (7) Eluição 100 mM I; (8) Eluição 100 mM II; (9) Eluição 250 mM I; (10) Eluição 250 mM II.

Fonte: Elaborada pela autora.

A última etapa consistiu da purificação da cruzaina deste fragmento clivado. Para isso, foi utilizada a resina tiopropil sefarose 6B (Thiopropyl SepharoseR 6B – GE Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada com tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio; 150 mM NaCl; pH 7,2). A amostra contendo a cruzaina foi dissolvida numa mistura da resina com tampão de ligação numa proporção de 20 vezes o volume da amostra de proteína.

A amostra da proteína ativada foi adicionada à resina previamente lavada e equilibrada, juntamente com o tampão de ligação e incubada *overnight* a 4°C, sob agitação lenta. Posteriormente, a resina ligada a proteína, foi separada da mistura pela utilização de uma coluna de bancada. A eluição da proteína ocorreu pela lavagem da resina com tampão de ligação suplementado com 20 mM de DTT. A enzima pura foi então lavada em sistema de ultra filtração Amicon para a troca de tampão, sendo armazenada em alíquotas de 30 µL a -80°C, em tampão contendo 0,1 M NaAc e 0,000005% Triton X-100, pH 5,5. Como indicado

pelo gel de SDS (**Figura 12**), há uma perda significativa de enzima ao longo do processo de purificação. A quantificação da concentração de enzima ativa resultante do processo de purificação foi realizada por titulação utilizando-se o inibidor E-64 e foi de 15 μM .

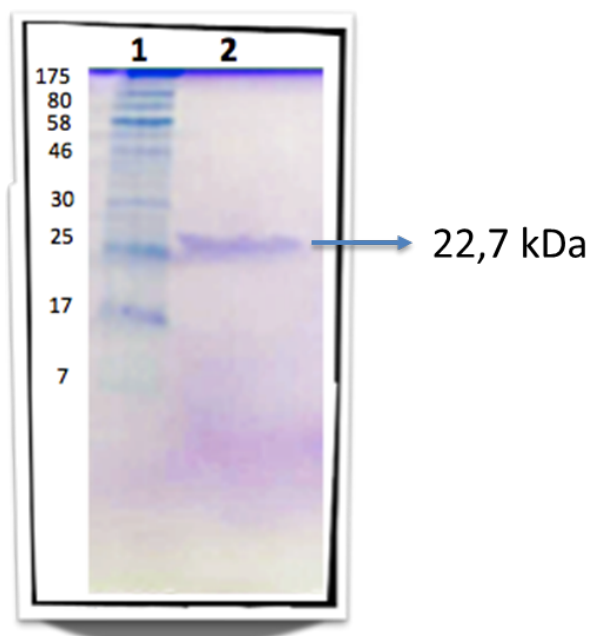


Figura 12 - Gel SDS PAGE 12% após a última etapa de purificação, mostrando a diminuição do peso molecular da cruzaína após o processo de ativação. (1) Marcador; (2) Cruzaína ativada.
Fonte: Elaborada pela autora.

3.5 Ensaios enzimáticos

Ensaio bioquímicos para a cruzaína são bem estabelecidos na literatura e realizados com alta padronização e validação em nosso laboratório. A atividade catalítica da cruzaína é medida com base na clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC (benziloiloxycarbonil-fenilalanina-arginina-aminometilcumarina), que ao ser clivado gera o grupo repórter 7-amino-4-metilcumarina (**Figura 13**). Para monitoramento da fluorescência utilizamos os comprimentos de onda de 355 nm para excitação e 460 nm para emissão. Esta metodologia é baseada na transferência intramolecular de energia de fluorescência (IFETS, sigla em inglês para *Intramolecular Fluorescence Energy Transfer*).⁸⁰

Nesse trabalho, definimos como critério a triagem inicial dos compostos contra a cruzaína na concentração padrão de 100 μM . Os compostos que inibiram a atividade catalítica da cruzaína, numa faixa superior a 50% nessa concentração, foram selecionados para determinação de valores de IC_{50} , bem como para estudos do mecanismo de inibição. Todos os ensaios foram realizados em triplicata em pelo menos dois experimentos independentes.

O ensaio foi realizado com 1,5 nM de cruzaína e 5,0 μ M de substrato ($K_m = 1 \mu$ M), em tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 5,5, na presença de 5 mM de DTT³⁵ e 0,01% de Triton X-100.⁸¹ As leituras foram realizadas durante 300 s, em temperatura constante de 30°C, em placas pretas de 96 poços, utilizando um espectrofluorímetro PerkinElmer, modelo Victor™. Os resultados destas leituras foram analisados e interpretados com auxílio dos *softwares* GraphPad Prism (versão 6.04 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) e SigmaPlot (versão 13, Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.sigmaplot.com), também utilizados para geração dos gráficos, determinação dos valores de IC_{50} e K_i . Os valores de emissão intrínseca de todos os compostos

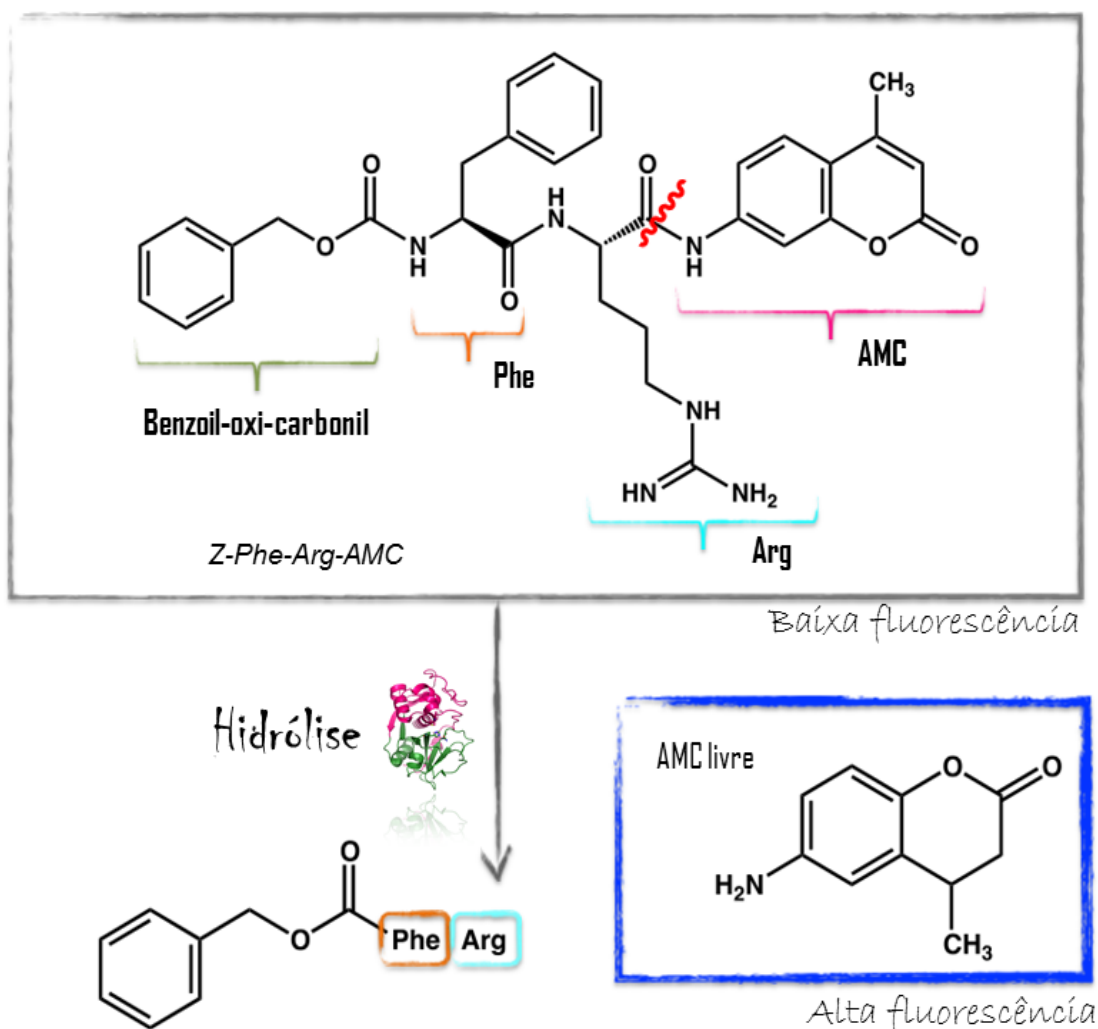


Figura 13 - Esquema da clivagem do substrato Z-Phe-Arg-AMC, utilizado neste trabalho para determinação dos parâmetros cinéticos.

Fonte: Elaborada pela autora.

3.6 Docagem molecular

O pacote de programas GOLD,⁷⁹ “*Genetic Optimization for Ligand Docking*” foi utilizado neste trabalho para a realização das docagens moleculares necessárias para predição das interações proteína-ligante. Nele está implementado um algoritmo genético para a docagem de ligantes flexíveis em sítios de ligação de proteínas. A estrutura cristalográfica utilizada como receptor, depositada no PDB sob o código 3KKU,³³ foi escolhida dentre as estruturas da cruzaina disponíveis no PDB, devido à sua alta resolução (1,28 Å) e por representar o complexo entre a cruzaina e o primeiro composto líder (**composto 1**).

Com o auxílio do programa Sybyl-X 2.0 (Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA), a estrutura da proteína foi preparada para as simulações. Moléculas de água, o ligante e as duplas conformações dos resíduos foram removidos. Átomos de hidrogênio foram adicionados e a protonação dos resíduos catalíticos, His162 (forma protonada) e Cys25 (forma desprotonada), foi checada com especial atenção afim de mimetizar o estado encontrado em solução.^{35,82}

As estruturas tridimensionais das pequenas moléculas foram geradas utilizando-se os parâmetros geométricos padrão contidos no Sybyl. Cada composto foi submetido à minimização de energia pelo campo de força Tripos,⁸³ algoritmo de gradiente conjugado Powell,⁸⁴ critério de convergência de 0,05 kcal/molÅ. Cargas de Gasteiger-Hückel⁸⁵ foram atribuídas a cada átomo.

A região da proteína a ser utilizada nas simulações de docagem molecular foi definida incorporando-se todos os resíduos de aminoácido contidos em uma esfera de 12 Å, centralizada no átomo de enxofre da Cys25. As simulações foram realizadas utilizando-se os parâmetros padrão do GOLD. A função de ranqueamento *GoldScore* foi empregada para selecionar 10 poses representativas para cada composto. As soluções encontradas pelo programa foram inspecionadas visualmente, para a verificação da complementariedade mútua entre as superfícies moleculares do ligante e da proteína, padrão de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

3.7 Parasitas e cultura celular

Os ensaios para verificação da potência dos compostos contra o *T. cruzi* foram realizados utilizando-se a cepa Tulahuen, parasitas geneticamente modificados para expressarem o gene da β -galactosidase de *Escherichia coli*, lacZ,⁸⁶ que catalisa uma reação

colorimétrica com vermelho de clorofenol β -D-galactopiranosídeo (CPRG, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) como substrato. Esta cepa nos foi gentilmente fornecida pelo pesquisador Frederick S. Buckner da University of Washington em Seattle, WA, USA.

A forma epimastigota do *T. cruzi* Tulahuen foi cultivada em laboratório, em meio de cultura LIT (da sigla em inglês para *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina. Tripomastigotas foram coletadas do supernadante de culturas celulares infectadas.⁸⁷

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

3.8 Ensaio contra a forma intracelular amastigota do *T. cruzi*

Os ensaios foram realizados em placas de cultura de tecidos de 96 poços (Becton Dickinson). Fibroblastos humanos foram semeados a 2×10^3 células por poço em 80 μ L de meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol e incubados *overnight*. No dia seguinte, tripomastigotas expressando β -galactosidase (cepa Tulahuen) foram adicionados a $1,0 \times 10^4$ por poço em 20 μ L de meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol. Após 24 h, os compostos sintéticos, inibidores da cruzaina, foram adicionados em diluições seriadas de 50 μ L, cobrindo uma faixa de 300 a 0,4 μ M. Cada concentração de composto foi avaliada em triplicata. As soluções estoque foram preparadas em DMSO e diluídas em RPMI 1640 sem vermelho de fenol. Após 72 h de incubação, as placas foram inspecionadas em um microscópio invertido para assegurar o crescimento dos controles e esterilidade das culturas. Em seguida, 50 μ L do substrato, contendo CPRG e Nonidet P-40 (concentração final de 0,1%), foram adicionados a cada um dos poços. Parasitas viáveis apresentam atividade β -galactosidase e são capazes de metabolizar o substrato adicionado, tornando o meio de amarelo para vermelho.

Afim de quantificar essa atividade remanescente após a incubação com os compostos teste, as culturas foram submetidas a leitura em espectrofotômetro com leitor de placas automático utilizando-se um comprimento de onda de 570 nm. Os dados obtidos foram transferidos para o *software* SigmaPlot para determinação dos valores de IC_{50} . O fármaco benznidazol (**BZ**) foi utilizado como controle positivo neste ensaio e culturas de parasitas não submetidas à incubação com os compostos teste foram utilizadas como controle negativo.

3.9 Ensaio de citotoxicidade em fibroblastos humanos HFF1

A citotoxicidade dos compostos contra a linhagem celular humana utilizada como célula hospedeira para a determinação da potência dos compostos teste contra o *T. cruzi* foi avaliada pelo método MTS.⁸⁸ A linhagem celular de fibroblastos HFF1 foi plaqueada numa concentração de 2×10^3 células por poço numa placa de cultura de 96 poços (TPPTM) e incubadas *overnight*. Em seguida, sete concentrações (100 – 0,1 μ M) de cada composto teste foram adicionadas em triplicata aos poços e as placas foram incubadas por 72 h a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% CO₂. Foram adicionados 20 μ L do reagente MTS (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) aos poços e a placa foi incubada por mais 4 h a 37°C.

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

3.10 Ensaio de pré-toxicidade *in vivo*

Para os ensaios *in vivo*, camundongos BALB/c foram obtidos da Universidade de São Paulo – USP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto e mantidos sob condições padrão na casa de animais do CBEM-USP São Carlos. Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal de São Carlos, e estão de acordo com o comitê internacional de ética em pesquisa animal. Além disso, este estudo está de acordo com o princípio dos 3R (do inglês *Replacement, Reduction, Refinement*), no qual métodos alternativos ao uso de animais, o refinamento de técnicas com o objetivo de diminuir, sempre que possível, o sofrimento e o número de animais no estudo, são propostos.

Compostos sintéticos que mostraram atividade *in vitro* contra o *T. cruzi* foram submetidos a testes de toxicidade aguda. Para isto, 6 mg de cada um dos compostos avaliados foram diluídos em DMSO (30%) mais Tween (10%), sendo esta a solução estoque. Os estoques finais foram diluídos numa concentração de 5 mg/mL em água destilada.

Em seguida, para cada composto avaliado, um camundongo BALB/c fêmea de 18 a 20 g foi usado para a aplicação cumulativa do respectivo composto teste por via intraperitoneal (i.p.). Seis doses foram injetadas durante um período de 6 h, resultando numa dose final de

150 mg/Kg. Após as administrações dose-tempo-dependentes, os camundongos foram observados por 48 h para verificar sinais de toxicidade aguda e então foram eutanaziados.

3.11 Estabilidade metabólica *in vitro* determinada utilizando microsossomos de fígado

A partir deste subcapítulo serão descritas as metodologias utilizadas neste trabalho para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos dos compostos, objetos de estudo desta tese. A descrição completa sobre a implementação e uso destas abordagens no meio acadêmico e na indústria farmacêutica podem ser encontradas nas referências de 89 a 114, listadas neste trabalho.⁸⁹⁻¹¹⁴

Para a realização deste experimento, microsossomos isolados foram adquiridos de empresas especializadas (BD Gentest – microsossomos de fígado de camundongo; XenoTech – microsossomos de fígado humano). Estes microsossomos foram adicionados (concentração final de 0,25 mg/mL) a uma solução contendo fosfato de potássio dibásico (concentração final de 40 mM), e fosfato de potássio monobásico (concentração final de 10 mM).

Soluções estoque de 5 mM para cada composto teste foram preparadas em DMSO. Uma solução *quench* foi preparada contendo 50% de acetonitrila e 50% de metanol. Além disso, foi necessária a preparação de uma solução de NADPH (10 mM), cofator utilizado pelas enzimas CYP450.

Placa de incubação: 450 µL da preparação contendo microsossomos foram adicionados a cada poço da placa que foi então aquecida a 37°C por 10 min. **Placa teste:** 2 µL do composto teste (estoque 5 mM) foram adicionados aos respectivos poços. Em seguida, 300 µL da preparação contendo os microsossomos foram adicionados a cada poço contendo o composto teste. Esta mistura foi homogeneizada e pré-aquecida sob rotação leve, durante 5 min, em estufa a 37°C. À placa de incubação, previamente aquecida, foram adicionados 90 µL da mistura contida na placa teste perfazendo um volume total de 540 µL. Amostras foram coletadas após tempos de incubação específicos (0, 5, 10, 15, 20 e 30 min).

Para a placa da amostra de 0 min, 180 µL da solução *quench* foram adicionados a cada poço. Em seguida, 6 µL da solução de NADPH e finalmente, 54 µL da mistura contida na placa de incubação. Esta placa foi então selada, homogeneizada e armazenada a 4°C. Em seguida, foram adicionados 54 µL da solução de NADPH à placa de incubação e a mistura foi homogeneizada. Antes da coleta de cada amostra nos tempos pré-estabelecidos, 45 µL da solução *quench* foram adicionados em cada poço de cada placa correspondente. Após atingir

o tempo de incubação desejado, amostras de 60 μL da placa de incubação foram adicionadas à placa correspondente. As placas foram seladas e armazenadas a 4°C. Depois da amostra para o último ponto ter sido coletada e adicionada à respectiva placa, todas foram centrifugadas a 3.800 rpm por 30 min. O sobrenadante de cada poço foi coletado e transferido para placas de limpas que foram submetidas à análise por espectrometria de massas. De 5 a 10 μL de cada amostra foram injetados num instrumento do tipo AB Sciex Triple Quad 5500 para análise LC-MS/MS.

3.12 Estabilidade determinada pela utilização de enzimas CYP450 recombinantes

Os compostos teste foram dissolvidos em DMSO de forma que a concentração final fosse de 5 mM. Adicionalmente foi preparada uma solução de NADPH (10 mM) em tampão de fosfato de potássio (50 mM). Uma solução (**rCYP**) para cada uma das enzimas recombinantes da família do CYP450 selecionadas (1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 e 3A4) foi preparada dissolvendo-se a enzima (concentração final de 100 pmol/mL) em tampão fosfato de potássio (50 mM). Uma solução *quench* foi preparada contendo 50% de acetonitrila e 50% de metanol. **Placa de incubação:** foram adicionados 320 μL da solução rCYP correspondente por poço. **Placa de compostos:** foi adicionado 1 μL da solução de cada composto (estoque a 5 mM em DMSO) aos poços correspondentes. Adicionou-se então 100 μL da solução rCYP correspondente a cada poço (concentração final do composto no ensaio foi de 5 μM). Em seguida, 10 μL do composto diluído na placa de compostos foram adicionados à placa de incubação e a solução foi homogeneizada. Esta placa foi pré-incubada por 10 min a 37°C numa estufa sob rotação a 600 rpm. À placa de tempo 0 min, foram adicionados 30 μL da solução de *quench* por poço. Além disso, 1 μL da solução de NADPH foi adicionado e, finalmente, 9 μL da solução contida na placa de incubação. A mistura foi homogeneizada, a placa selada e armazenada a 4°C.

A placa de incubação tornou à estufa a 37°C sob agitação a 600 rpm. Amostras de 10 μL em tempos de incubação distintos (5, 10, 20, 30 e 60 min) foram coletadas da placa de incubação contendo os compostos e as CYPs. Para cada tempo uma placa distinta foi utilizada e continha 30 μL de solução *quench*, além da amostra do composto teste proveniente da placa de incubação. Após a coleta da última amostra, as placas foram centrifugadas por 20 min a 3.000 rpm. O sobrenadante de cada poço foi coletado e transferido para placas novas que foram submetidas à análise por espectrometria de massas. De 5 a 10 μL de cada amostra

foram injetados num instrumento do tipo AB Sciex Triple Quad 5500 para análise LC-MS/MS.

3.13 Determinação da estabilidade metabólica em hepatócitos

Neste ensaio os compostos foram incubados com hepatócitos de diferentes espécies (rato e humano) em placas de 96 poços. Amostras foram coletadas em 6 tempos distintos durante o período de incubação e analisadas por LC-MS/MS para determinação da meia vida e *clearance* intrínseco. O meio de incubação consistiu da suplementação do meio de Williams (Invitrogen, A12176-01) com 2 mM (concentração final) de L-glutamina e 15 mM (concentração final) de HEPES. Os inibidores foram preparados em soluções estoque (8,75 mM de azamulina e 350 mM de 1-ABT). Os compostos teste foram adicionados numa placa e dissolvidos em meio de incubação afim de que a concentração final fosse de 2 μ M. Em outra placa, 50 μ L desta solução foram adicionados e incubados a 37°C em estufa (5% de CO₂) por 30 min.

Hepatócitos criopreservados (Celsius) foram aquecidos em banho molhado a 37°C por 3 a 5 min e dispensados (2 *vials* de hepatócitoso por 50 mL de meio) em meio InVitroGRO HT (suplementado com 10% FBS; 0,15 μ M de hidrocortisona; 0,2 mg/mL de BSA, frutose, insulina e aminoácidos) em tubos falcon de 50 mL e homogeneizados. A mistura foi centrifugada a 500 rpm (~50 g) por 5 min afim de peletar as células. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 mL de meio de incubação pré aquecido a 37°C. As células foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas a 1×10^6 células viáveis por mL de meio de incubação. Essa mistura foi dividida em 3 amostras: 1) sem inibidor; 2) com o composto azamulina (concentração final de 25 μ M), inibidor da CYP3A4; 3) com o composto aminobenzotriazol (1-ABT; concentração final de 1 mM), inidor de todas as CYPs. Para os ensaios de inibição química, os hepatócitos foram pré-incubados com o respectivo inibidor por 30 min antes da adição dos compostos teste.

À placa onde os compostos teste foram previamente adicionados e aquecidos, foi adicionado o volume correspondente de forma que se tivesse 12.500 células viáveis por poço. A placa foi incubada a 37°C em estufa com 5% de CO₂ sob agitação contínua a 300 rpm. Uma placa específica para cada intervalo de tempo (0, 15, 30, 60, 120 e 240 min) foi preparada. Atingido o tempo de incubação estabelecido, a atividade enzimática foi interrompida pela

adição de 75 μL de uma solução gelada de acetonitrila e a amostra foi submetida a leitura por LC-MS/MS.

3.14 Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA)

Inicialmente, os compostos teste foram dissolvidos em DMSO numa concentração final de 5 mM. Os compostos foram adicionados aos respectivos poços da placa estoque e dissolvidos em tampão de fosfato salino (PBS; pH 6,5; 1% DMSO v/v) afim de que a concentração final de composto correspondesse a 1 μM .

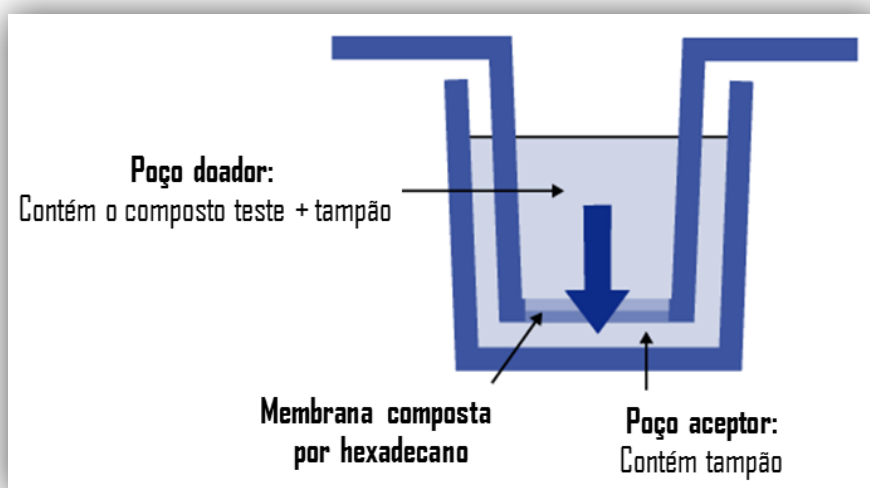


Figura 14 - Esquemática da estrutura de um poço da placa utilizada para o experimento de PAMPA. Fonte: Elaborada pela autora.

Foram adicionados aos respectivos poços da câmara doadora (placa superior, **Figura 14**) 300 μL da solução doadora do composto teste correspondente. À câmara acceptora (placa inferior, **Figura 14**) foram adicionados 200 μL do tampão PBS, pH 7,4. Finalmente, a placa doadora foi sobreposta à placa acceptora. A placa montada foi incubada a 37°C por 5 h sob agitação leve. É interessante observar que a diferença de pH (6,5 da câmara doadora e 7,4 da câmara acceptora) é uma tentativa de mimetizar as condições fisiológicas do corpo humano, onde o pH no interior do intestino é ligeiramente mais ácido (em torno de 6,5) do que o pH do sangue (7,4).

Para análise da concentração dos compostos por espectrometria de massas, duas placas (uma para a porção doadora e outra para a acceptora) foram preparadas contendo 300 μL de MEOH:ACN 50:50. Além disso, à placa para análise do conteúdo do poço doador, 90 μL de

PBS pH 6,5 e 10 μL do conteúdo da placa superior de PAMPA foram adicionados. Para a placa de análise do poço acceptor, 100 μL do conteúdo da placa inferior de PAMPA foram adicionados. Como controle adicional, afim de descartar ou identificar a decomposição/instabilidade intrínseca do composto em solução, amostras da placa estoque foram submetidas a análise por LC/MS/MS.

A permeabilidade aparente de cada composto é calculada a partir da equação:

$$\text{Permeabilidade (cm/s)} P_e = \frac{-\ln\left[1 - \frac{C_{A(t)}}{C_{\text{equilíbrio}}}\right]}{A * \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) * t}$$

Onde:

$$C_{\text{eq}} = [C_{D(t)} * V_D + C_{A(t)} * V_A] / (V_D + V_A)$$

C_0 = concentração inicial do composto no poço doador

$C_{D(t)}$ = concentração do composto no poço doador no tempo t

$C_{A(t)}$ = concentração do composto no poço acceptor no tempo t

V_D = volume adicionado ao poço doador

V_A = volume adicionado ao poço acceptor

A = área do filtro (membrana de hexadecano)

t = tempo de incubação em segundos

Como critério geral para classificação dos compostos quanto a permeabilidade, compostos que apresentaram $P_e \geq 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s foram classificados como permeáveis, enquanto compostos que apresentaram valores inferiores a este foram considerados como pouco ou não permeáveis.

3.15 Determinação experimental do LogD

Para a realização deste ensaio 5 μL de cada composto foram diluídos (a partir do estoque de 5 mM em DMSO) em 245 μL de um tampão com pH fisiologicamente relevante (50/50 tampões A/B). O tampão A consistiu de 5% de metanol em 10 mM de acetato de amônio, pH 7,4. O tampão B consistiu de 100% de metanol, pH 7,4.

Além disso, 9 compostos comercialmente disponíveis e com valores de LogD e tempos de retenção nas colunas descritos na literatura (aciclovir, atenolol, antipirina, fluconazol, metoprolol, carbamazepina, cetoconazol, tolnaftato e amiodarona; valores de

LogD de -1,86 a 6,1) foram submetidos à leituras por LC-MS/MS em triplicata antes e depois da leitura dos compostos teste.

O tempo de retenção de cada composto em colunas C18 foi registrado. O tempo de retenção de cada um dos 9 compostos padrão foi plotado contra o respectivo valor de LogD descrito na literatura. A equação resultante para esta linha, $y = mx + b$, é utilizada para calcular os valores de LogD para os compostos teste. O “x” é substituído pelo tempo de retenção em minutos para cada composto teste e o valor resultante para “y” é o valor experimental de LogD para o respectivo composto teste.

3.16 Determinação da fração livre dos compostos (fu)

A ligação inespecífica de um composto à enzimas contidas nos meios e tampões em que é avaliado e mesmo *in vivo*, à proteínas plasmáticas por exemplo, pode diminuir consideravelmente a sua biodisponibilidade. Por isso a correção, por meio da determinação da sua fração livre após a incubação com plasma, microsomas, ou qualquer tecido homogeneizado, é essencial para a precisão da predição do *clearance* metabólico. Neste trabalho, a fração livre dos compostos teste foi determinada para microsomas, plasma e tampão contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). Para isso realizou-se a diálise de equilíbrio, em uma placa de 96 poços (HT-Dialysis, modelo HTD96b), onde cada poço é dividido por uma membrana semi-permeável (MWCO 12-14 kDa). De um lado foi adicionado o composto teste (misturado à matriz de interesse – plasma, microsomas, ou qualquer tecido homogeneizado) e do outro, o tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4). Uma curva padrão foi utilizada para cada composto por matriz para calcular a concentração do composto (% livre, **fu** do inglês *fraction unbound*) de ambos os lados.

As concentrações de composto teste utilizadas foram de 1, 2, 20, 200, 2000 e 5000 nM. A preparação das soluções estoque de cada composto foi feita pela homogeneização do mesmo em DMSO afim de obter-se uma concentração final de 1 mM. Em 500 µL de matriz foram adicionados 0,5 µL da solução estoque do composto e essa foi a mistura adicionada a um dos lados do poço dividido pela membrana. Cada composto foi avaliado em triplicata. Após montada, a placa foi selada e incubada a 37°C sob rotação leve (150 rpm) por 4 h. Após o período de incubação, as placas para análise foram preparadas e submetidas à análise por LC-MS/MS.

A porcentagem de composto recuperado e a fração livre são calculadas a partir das equações seguintes:

% de recuperação = ((concentração do composto no tampão + concentração do composto na matriz)/concentração no T₀) * 100

fu (fração livre) = concentração do composto no tampão / concentração do composto na matriz

É importante destacar aqui que o **fu** determinado é utilizado apenas como fator de correção para determinação dos demais parâmetros farmacocinéticos e não como critério de seleção das moléculas.

3.17 Biotransformação e análise dos metabólitos formados após incubação do composto teste com microsomas

Antes de iniciar o ensaio os compostos teste são dissolvidos em DMSO numa concentração estoque de 5 mM. A concentração teste de 1 mM de cada composto foi obtida pela adição de H₂O/MeOH:2/1 (v/v). Uma solução de NADPH (10 mM), uma solução *quench* contendo 50% de acetonitrila e 50% de metanol, e um tampão contendo 100 mM de fosfato foram preparados. Microsomas isolados foram adquiridos de empresas especializadas (BD Gentest – microsomas de fígado de camundongo; XenoTech – microsomas de fígado humano). Os microsomas foram dissolvidos numa solução de incubação contendo 100 mM de fosfato, afim de que a concentração final fosse de 2 mg/mL. Duas placas foram preparadas, uma para o tempo 0 min e outra para o tempo 60 min.

À ambas as placas (0 e 60 min) foram adicionados 178 µL da solução de incubação contendo os microsomas e 2 µL da solução estoque do composto teste (concentração final no ensaio foi de 5 µM). As placas foram pré-incubadas a 37°C por 5 min sob agitação leve. Após esse período, à placa de tempo 0 min foram adicionados 400 µL de solução *quench* seguido da adição de 20 µL da solução estoque de NADPH. A placa foi selada, o conteúdo homogeneizado e mantida sob refrigeração. À placa de 60 min foram adicionados: 20 µL da solução de NADPH e esta foi selada e submetida à incubação a 37°C por 60 min sob agitação leve. Após esse período foram adicionados 400 µL de solução *quench*. Ambas as placas foram então submetidas à centrifugação (4°C, 3.300 rpm, 30 min) e o sobrenadante foi submetido à análise por espectrometria de massas.

3.18 Determinação das propriedades farmacocinéticas *in vivo*

O perfil farmacocinético *in vivo* dos compostos foi determinado utilizando-se camundongos CD1 machos, pesando 50 g. Os compostos foram administrados em dose única por via oral (0,5 mg/Kg) e intra-venosa (0,5 mg/Kg). Como veículo foi utilizada a diluição nas proporções de 2:5:20:73 (v/v) de solução estoque do composto em DMSO : Tween 80 (Polisorbato 80) : PEG-400 : D5W (5% dextrose em água). O volume de injeção foi de 10 mL/Kg. A concentração plasmática remanescente foi monitorada ao longo do tempo pela coleta de amostras (40 µL) de sangue nos intervalos de tempo de 10, 25 e 50 min; 1, 3, 6, 9, 12 e 24 h após a administração do composto, utilizando-se a técnica de espectrometria de massas LC-MS/MS.

3.19 Análise por LC-MS/MS e cálculo das propriedades farmacocinéticas

Para o experimento de biotransformação e análise dos metabólitos formados após a incubação com os microsossomos, o sistema de análise consistiu de UHPLC (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*) Thermo Accela conectado a um injetor de amostras automático e uma bomba da série 1250. O sistema UHPLC foi conectado a um espectrômetro de massas Thermo Fisher LTQ Orbitrap.

Para todas as demais análises envolvendo LC-MS/MS o sistema consistiu de espectrômetros de massa do tipo AB Sciex Triple Quad 5500 acoplados a um UHPLC equipado com um detector diodo infinity UV 1290 da Agilent Technologies (Santa Clara, CA) e um CTC PAL auto coletor da LEAP Technologies (Carrboro, NC). O modo íon positivo Q1 MS, faixa de massas 300-500 Da foi utilizado para detecção de íons do composto parental. O detector de UV foi operado no modo espectral, 250-280 nm. A coluna HPLC foi Thermo Hypersil Gold C18 (100_2.1 mm, 1.9 mM, Thermo Fisher Scientific). As fases móveis consistiram do solvente A (0,1 % de ácido fórmico em água) e solvente B (0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila). O fluxo foi de 0,55 mL/min e o volume de injeção de 20 mL. O gradiente iniciou com 1 % do solvente B por 0,4 min, aumentando para 40 % do solvente B em 2,3 min, 95 % do solvente B em 0,67 min (mantidos por 0,5 min), voltando-se para as condições iniciais de 1 % do solvente B (mantendo-se por 1 min para equilibrar a coluna antes da injeção da próxima amostra).

A razão entre a área dos picos (área do pico para o composto de interesse / área do pico do composto utilizado como padrão no ensaio) foi convertida para porcentagem de

composto remanescente utilizando-se a razão obtida para o tempo 0 min como 100%. A meia vida ($T_{1/2}$) e o *clearance* intrínseco foram calculados a partir da porcentagem de composto remanescente *versus* o tempo de incubação. A partir do gráfico resultante, a inclinação da reta (*slope* ou k) foi determinada. As equações abaixo foram utilizadas para determinar a meia vida em minutos e o *clearance* intrínseco (CL_{int}) em $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$. A regressão não linear da porcentagem de composto remanescente ao longo do tempo é utilizada para calcular k .

$$T_{1/2 \text{ (min)}} = \ln(2)/k$$

$$CL_{int_in_vitro} (\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}) = k * 1000/0.25$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos inibidores da enzima cruzaina foi desenvolvido com base no conhecimento da especificidade do substrato.¹⁸ São, portanto, inibidores peptídicos irreversíveis que se ligam covalentemente à enzima. Devido à sua natureza irreversível, essa classe de inibidores pode levar a efeitos adversos importantes em função de interações inespecíficas.

No presente trabalho de tese, o objetivo foi explorar inibidores que atuam de maneira reversível. Assim, dois compostos líderes **1** ($IC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$ e $K_i = 2 \mu\text{M}$) e **2** ($IC_{50} = 2,2 \mu\text{M}$ e $K_i = 0,8 \mu\text{M}$) (descritos no **capítulo 3**, item **3.1**), com elevada potência e afinidade, além de boas propriedades fármaco-similar,⁵⁸ foram selecionados como pontos de partida para o nosso projeto de otimização molecular. Diversas modificações estruturais, em diferentes regiões dos compostos líderes, foram exploradas levando ao estabelecimento de relações entre a estrutura e atividade (**SAR**) para as novas séries de inibidores com atividade anti-*T. cruzi*.

4.1 Planejamento e avaliação de derivados benzimidazólicos – composto líder 1

O planejamento e a determinação de propriedades biológicas de moléculas derivadas do composto líder **1**, um derivado benzimidazólico (descrito na metodologia, subitem **3.1**, **Figura 10 A**), estão descritos a seguir.

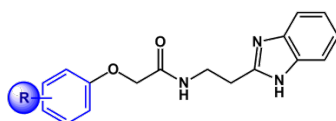
4.1.1 Atividade biológica e modelagem molecular de derivados benzimidazólicos, análogos do composto líder 1

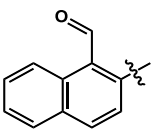
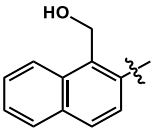
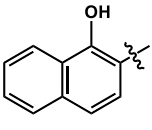
A avaliação bioquímica desta série de compostos contra a enzima cruzaina permitiu uma investigação circunstanciada de SAR. Quatro etapas de síntese permitiram explorar o impacto das modificações no anel fenila, no espaçador (cadeia alifática entre os dois sistemas de anéis) e no benzimidazol. Este trabalho foi conduzido por meio de estudos de modelagem molecular.

As investigações foram iniciadas com a avaliação de derivados do ácido α -fenoxiacético (**Tabela 1**). Os resultados indicam que modificações são toleradas no anel aromático que ocupa o bolsão S2 da cruzaina. A substituição do átomo de bromo por outros halogênios: **3** ($IC_{50} 5,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$), **5** ($IC_{50} 3 \pm 0,6 \mu\text{M}$), **5** ($IC_{50} 1,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$); ou por uma metila: **8** ($IC_{50} 4,1 \pm 1,1 \mu\text{M}$); resultaram em compostos com modesta diminuição da potência

contra a enzima (de 2 a 6 vezes), quando comparado ao composto líder **3** ($IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \mu M$). Estes resultados sugerem que o bromo tem um volume ideal para a ocupação do subsítio S2. Modificações adicionais, como a sua substituição por grupos retiradores de elétrons como o NO_2 (**7**, $IC_{50} = 13,2 \pm 1,2 \mu M$) e CN (**7**, $IC_{50} = 65,1 \pm 1,2 \mu M$), ou por grupos doadores, como o NH_2 (**9**, IC_{50} ND), na posição *orto* da fenila, resultaram na diminuição da potência em 15, 80 e mais de 100 vezes, respectivamente. O análogo contendo como substituinte uma amina acetilada (**10**) foi ainda menos potente.

Tabela 1 - Estruturas e atividade inibitória dos compostos **1-19** contra a enzima cruzaina.



Composto	Anel	Substituinte			% Inibição (100 μM) ^a	IC_{50} (μM) ^b
		<i>orto</i>	<i>Meta</i>	<i>para</i>		
1	Fenil	Br	–	–	89	$0,8 \pm 0,1$
3	Fenil	F	–	–	92	$5,3 \pm 1,1$
4	Fenil	Cl	–	–	92	$3 \pm 0,6$
5	Fenil	I	–	–	96	$1,6 \pm 0,2$
6	Fenil	CN	–	–	81	$65,1 \pm 1,2$
7	Fenil	NO_2	–	–	93	$13,2 \pm 1,2$
8	Fenil	CH_3	–	–	88	$4,1 \pm 1,1$
9	Fenil	NH_2	–	–	43	ND
10	Fenil	$NHCOCH$	–	–	25	ND
11	Fenil	H	–	–	88	$10,9 \pm 1$
12	Fenil	–	Br	–	96	$0,8 \pm 0,5$
13	Fenil	–	–	–	96	$2,7 \pm 0,4$
14	2-naftil	Br	–	–	92	$0,21 \pm 0,04$
15	2-naftil	–	–	–	90	$3 \pm 0,5$
16	1-naftil	–	–	–	84	$5,2 \pm 0,7$
17		–	–	–	80	$13,5 \pm 0,6$
18		–	–	–	80	$12,7 \pm 0,8$
19		–	–	–	51	$8,2 \pm 0,9$

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC_{50} foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Os ensaios foram realizados em 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A presença de um átomo de Br na posição *meta* da fenila (**12**, $IC_{50} = 0,8 \pm 0,5 \mu\text{M}$) resultou em um composto igualmente potente, ao passo que na posição *para* (**13**, $IC_{50} = 2,7 \pm 0,4 \mu\text{M}$), um aumento de 4 vezes no valor de IC_{50} foi observado. Ainda que a mudança de posição do átomo de bromo seja tolerável, a sua remoção afeta a potência significativamente, uma vez que o valor de IC_{50} para o análogo sem o substituinte (**11**, $IC_{50} = 10,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$) é da ordem de 14 vezes superior ao do composto líder (**1**, $IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

O derivado 1-Br-2-naftila (**14**, $IC_{50} = 0,21 \pm 0,04 \mu\text{M}$), composto mais potente desta série, apresentou potência 4 vezes superior contra a enzima cruzaina quando comparado ao composto líder. Novamente, a importância do átomo de Br é demonstrada, uma vez que o análogo 2-naftila não substituído, **15** ($IC_{50} = 3 \pm 0,5 \mu\text{M}$), foi 15 vezes menos potente do que o que contém o Br (**14**). Já os análogos 1-naftila (**16**, $IC_{50} = 5,2 \pm 0,7 \mu\text{M}$) e 2-naftil (**15**, $IC_{50} = 3 \pm 0,5 \mu\text{M}$) demonstraram potência comparável.

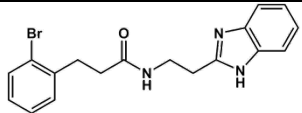
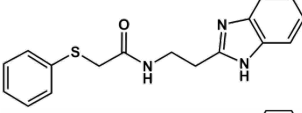
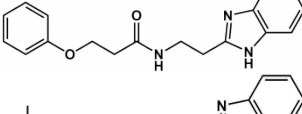
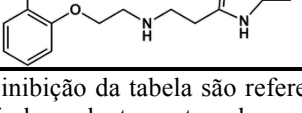
Outras modificações na porção naftila, como a substituição do Br por grupos como o carboxialdeído (**17**, $IC_{50} = 13,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$), hidroximetileno (**18**, $IC_{50} = 12,7 \pm 0,8 \mu\text{M}$) ou hidroxila (**19**, $IC_{50} = 8,2 \pm 0,9 \mu\text{M}$) foram toleradas, embora a atividade inibitória da cruzaina tenha diminuído em pelo menos uma ordem de magnitude em relação ao composto líder (**3**, $IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

As investigações subsequentes se concentraram na avaliação do impacto de modificações no espaçador entre a fenila (ou naftila) e o benzimidazol (**Tabela 2**). A importância do grupo funcional éter foi demonstrada quando comparamos o composto líder com os compostos **20** ($IC_{50} = 77,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$) e **21** ($IC_{50} = 38,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$), onde o átomo de oxigênio foi substituído por um metileno e um átomo de enxofre, respectivamente. Estas modificações resultaram na diminuição da potência em cerca de 50 (**20**) a 100 vezes (**21**), em relação ao composto líder (**1**, $IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$).

A análise do modo de interação do composto líder na cavidade de ligação da cruzaina, determinado cristalograficamente (PDB: 3KKU), mostra que o oxigênio presente no espaçador forma uma interação dipolo-dipolo com o átomo de nitrogênio da cadeia principal da Gly163 (**Figura 15**).

Os resultados de docagem molecular dos análogos sintetizados mostraram uma possível interação do átomo de enxofre do análogo tioéter (**21**, $IC_{50} = 38,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$) com a Gly163. No entanto a interação é mais fraca, uma vez que envolve um aceptor de ligação de hidrogênio mais fraco. Quando o éter é substituído por um metileno (**20**, $IC_{50} = 77,5 \pm 1,4 \mu\text{M}$), esta interação é naturalmente perdida.

Tabela 2 - Estruturas e atividade inibitória dos derivados **20**, **21**, **22** e **23** contra a enzima cruzaina.

Composto	Estrutura	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
20		51	77,5 \pm 1,4
21		66	38,4 \pm 1,2
22		25	ND
23		8	ND

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

Fonte: Elaborada pela autora.

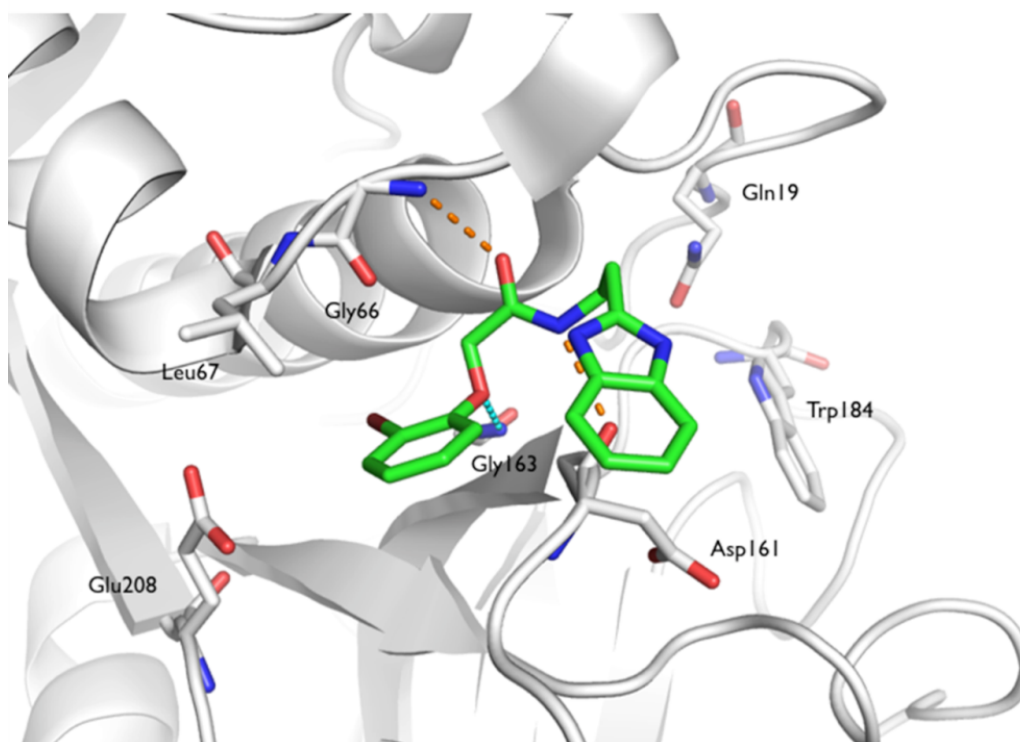


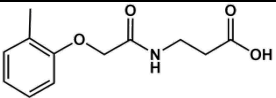
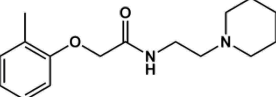
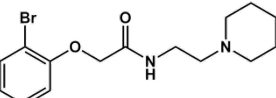
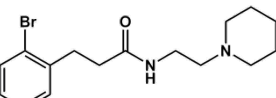
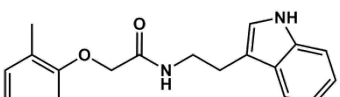
Figura 15 - Modo de ligação do derivado benzimidazólico (composto líder) de acordo com a estrutura cristalográfica em complexo com a cruzaina (PDB: 3KKU). Ligações de hidrogênio são mostradas como linhas pontilhadas coloridas de laranja e as interações dipolo-dipolo como linhas pontilhadas em ciano. Os resíduos envolvidos nestas interações foram destacados e representados como *sticks*. Figura preparada com Pymol.

Fonte: Elaborada pela autora.

A elongação do espaçador entre o éter e a amida pela adição de um grupo metileno deu origem ao composto **22**, que não exibe atividade inibitória. Com base no modo de ligação do composto líder no sítio ativo da cruzaina, modificações na amida teriam impacto na atividade inibitória. De fato, o composto contendo uma amina (**23**), obtido pela redução da amida (**8**, $IC_{50} = 4,1 \pm 1,1 \mu M$), não mostrou atividade inibitória contra a enzima. Essa mudança drástica na potência pode ser explicada pela perda da ligação de hidrogênio entre o oxigênio da carbonila e o átomo de nitrogênio da cadeia principal da Gly66, uma interação comumente observada em estruturas de complexos da cruzaina com inibidores.⁴ Outro efeito provável causado pela remoção deste grupo funcional é o aumento da flexibilidade do composto, resultando em perdas entrópicas na formação do complexo.

Considerando que no complexo enzima-inibidor o benzimidazol está exposto ao solvente, a substituição desse heterociclo bicíclico foi explorada (**Tabela 3**). Substituições por um anel piperidina-1-il (**26**, **25**, **27**), 1H-indol-3-il (**28**, **29**), 1H-imidazol-5-il (**36**, **37**) e uma piridina tetrassubstituída (**30**), bem como algumas bisamidas acíclicas simples (**31**, **32**, **33**, **35** e **36**) foram investigadas. Em todos os casos, a atividade de inibição da cruzaina foi perdida, indicando que o benzimidazol é essencial para essa pequena série de derivados.

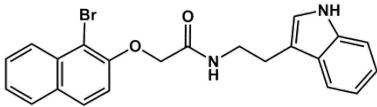
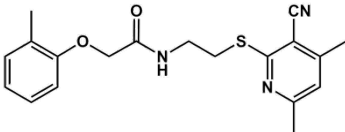
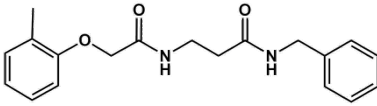
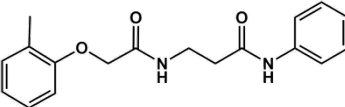
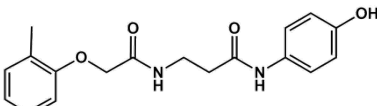
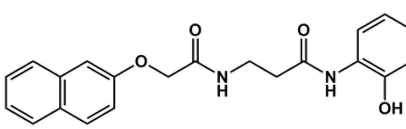
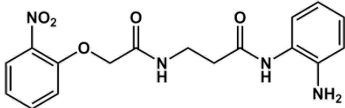
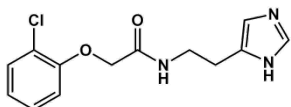
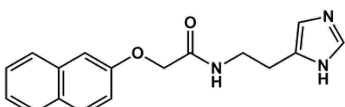
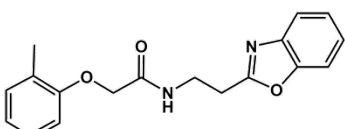
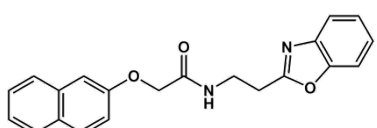
Tabela 3 - Estruturas e atividade de inibição da cruzaina para os derivados da substituição do benzimidazol.

Composto	Estrutura	% Inibição (100 μM) ^a	IC_{50} (μM) ^b
24		8	ND
25		3	ND
26		1	ND
27		7	ND
28		5	ND

(continua)

(continuação)

Tabela 3 - Estruturas e atividade de inibição da cruzafina para os derivados da substituição do benzimidazol.

Composto	Estrutura	% Inibição (100 μM) ^a	IC ₅₀ (μM) ^b
29		2	ND
30		13	ND
31		8	ND
32		4	ND
33		5	ND
34		14	ND
35		4	ND
36		14	ND
37		7	ND
38		33	ND
39		22	ND

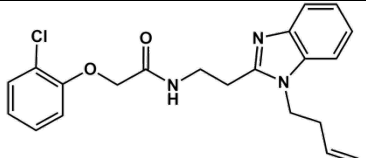
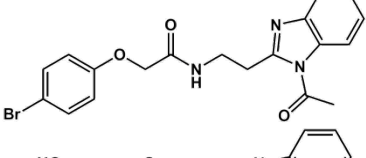
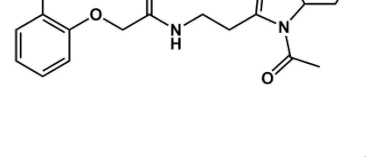
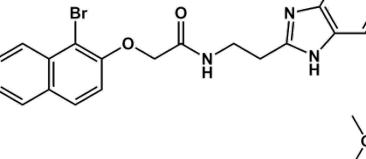
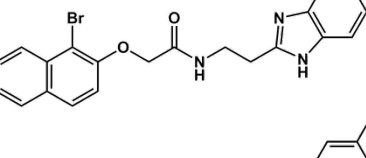
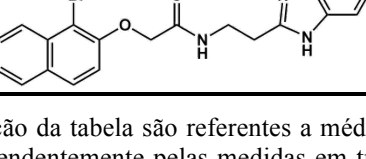
^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Os ensaios foram realizados em 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para averiguar essa hipótese, os derivados benzoxazo-2-il **38** e **39** foram sintetizados. É importante destacar que mesmo esta pequena mudança estrutural (NH por O) causou a completa perda da atividade inibitória da enzima. A diferença entre a atividade dos derivados benzimidazo-2-il e benzoxazo-2-il não pode ser explicada somente com base na análise estrutural dos complexos cruzaina-inibidor. Estudos adicionais serão necessários.

Os compostos 41–46 (**Tabela 4**) indicam que a adição de substituintes no anel benzimidazol é tolerável. N-substituintes causam a perda de potência (compostos **40**, **41** e **42**) enquanto compostos C-substituídos mantêm a afinidade pela cruzaina praticamente inalterada (compostos **43**, **44** e **45**).

Tabela 4 - Estruturas e perfis de inibição dos compostos com benzimidazo-2-il C- ou N-substituído.

Composto	Estrutura	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
40		89	23,9 \pm 1,2
41		84	9,9 \pm 0,9
42		47	ND
43		90	0,6 \pm 0,2
44		93	0,54 \pm 0,2
45		97	0,62 \pm 0,32

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nos resultados mostrados e discutidos acima, uma relação estrutura atividade (SAR) para os compostos avaliados até aqui foi estabelecida e é mostrada na **Figura 16**.

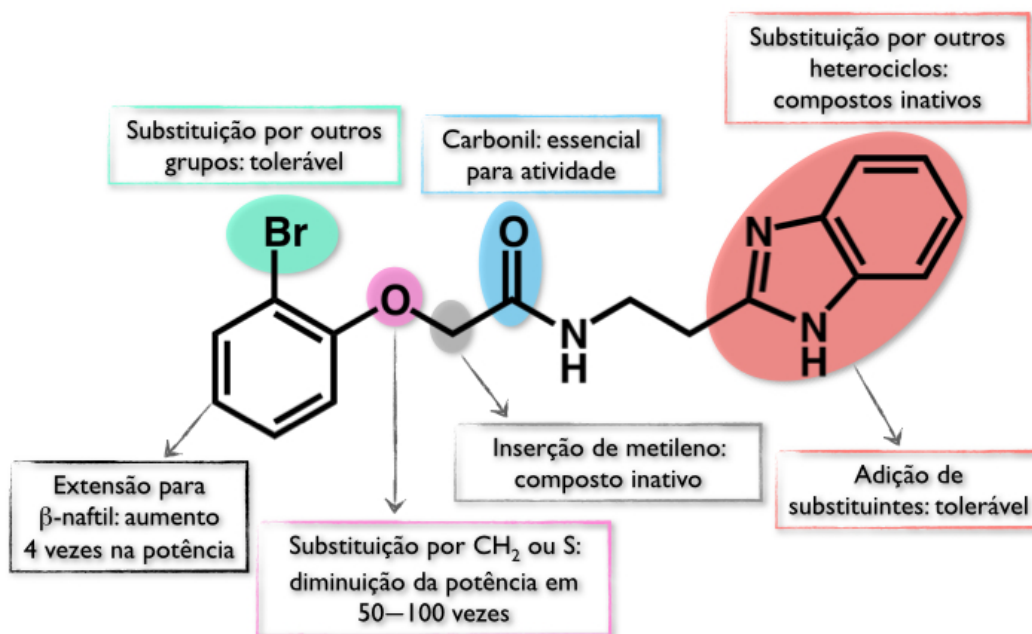


Figura 16 - Esquema de SAR para a otimização da série de derivados benzimidazólicos contra a cruzaina.
Fonte: Elaborada pela autora.

Com base no mecanismo de inibição competitivo do composto líder, seria esperado que os derivados otimizados atuassem pelo mesmo mecanismo. A avaliação da inibição da cruzaina, em diversas concentrações de inibidor e substrato, demonstrou que o composto **14**, um dos mais potentes desta série, atua pelo mecanismo competitivo ($K_i = 82$ nM), como mostrado no gráfico de Lineweaver-Burk (**Figura 17**).

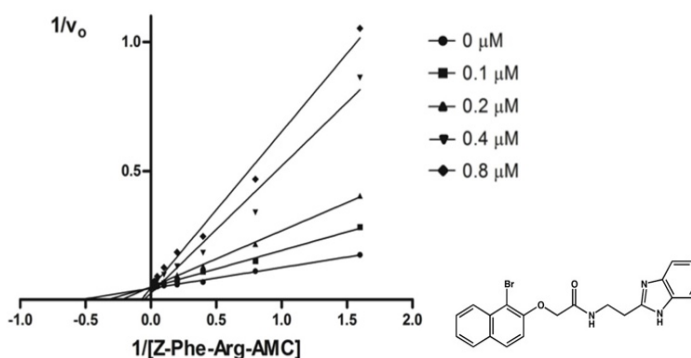


Figura 17 - Gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk para o composto mais potente, **14**.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Avaliação *in vitro* da atividade dos derivados benzimidazólicos contra o *T. cruzi*

A potente atividade inibitória contra a cruzaina apresentada por alguns compostos incentivou a avaliação da atividade *in vitro* contra o parasita (**Tabela 5**).

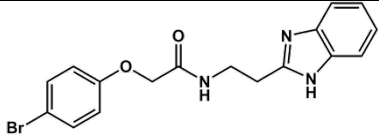
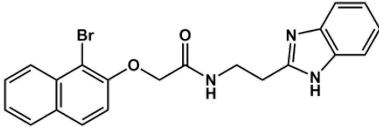
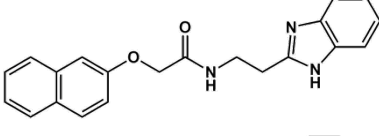
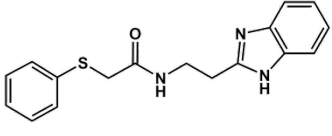
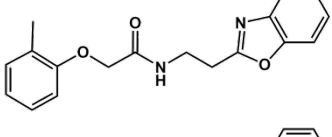
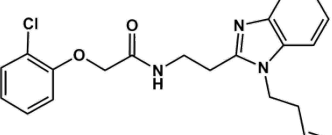
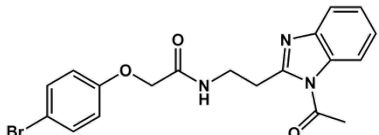
Tabela 5 - Atividade *in vitro* dos inibidores mais potentes da cruzaina contra o *T. cruzi* (forma amastigota).

Composto	Estrutura	IC ₅₀ (μM) ^a	PAMPA	eLogD	LogP	PSA
BZ		4,80 ± 0,52	3,17	0,84	1,00	92,74
1		1,63 ± 0,57	4,94	3,62	3,16	67
3		> 100	1,61	2,90	2,62	67,00
4		> 100	3,74	3,35	3,08	67,00
5		> 100	2,00	3,71	2,99	67,00
6		6,50 ± 2,10	2,08	2,58	2,29	90,80
7		7,90 ± 2,13	1,11	2,77	2,31	11,28
8		2,81 ± 0,75	5,87	3,58	2,9	67
12		> 100	3,68	NV	3,16	67,00
20		34,60 ± 2,57	4,66	3,78	3,82	57,78

(continua)

(continuação)

Tabela 5 - Atividade *in vitro* dos inibidores mais potentes da cruzaina contra o *T. cruzi* (forma amastigota).

Composto	Estrutura	IC ₅₀ (μM) ^a	PAMPA	eLogD	LogP	PSA
13		6,68 ± 2,35	3,96	3,79	3,16	67,00
14		16,22 ± 3,51	0,34	4,35	4,07	67,00
15		46,12 ± 6,21	0,73	3,94	3,32	67,00
21		> 100	2,90	3,04	2,97	57,78
38		2,90 ± 0,66	24,2	3,79	2,91	64,36
40		11,14 ± 3,19	6,83	4,06	4,22	56,15
41		5,25 ± 2,08	0,73	3,94	3,32	67,00

^aOs valores de IC₅₀ dos compostos contra o *T. cruzi*, cepa Tulahuen representam médias de pelo menos 3 experimentos individuais. BZ = benznidazol. Valores de eLogD e PAMPA foram determinados experimentalmente. LogP e PSA foram preditos computacionalmente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente, um conjunto de 17 compostos foi analisado, utilizando o fármaco padrão de referência, benznidazol – **BZ**, (Rochagan[®] da Roche), como controle positivo. Vários compostos demonstraram atividade tripanocida similar ou superior em relação ao **BZ**. Dentre eles, destacamos o composto líder, com um valor de IC₅₀ de 1,6 μM, três vezes mais potente que o fármaco padrão. Em relação ao **BZ** (eLogD = 0,84 e PAMPA = 3,17), o composto líder é mais lipofílico (eLogD = 3,78) e permeável (PAMPA = 4,66), o que lhe confere maior biodisponibilidade, uma característica desejável que pode estar relacionada ao efeitos observados.

Apesar da porção fenila do inibidor, que se liga ao bolsão S2 na enzima, ser suscetível a modificações que não afetam significativamente a atividade inibitória contra a cruzaina, diversas modificações foram desfavoráveis para a atividade tripanocida. Por exemplo, análogos com halogênios que não o bromo na posição *orto* (**3**, **4** e **5**), ou contendo um anel 1-naftila (**17**), não demonstraram atividade contra o parasita.

Um dos parâmetros farmacocinéticos que pode estar relacionado a esta perda da atividade é a permeabilidade. De acordo com os resultados provenientes do experimento de PAMPA, os valores de permeabilidade efetiva diminuíram em relação ao composto líder, passando de 4,66 (composto líder) para 1,61 (**3**), 3,74 (**4**), 2,0 (**5**) e 2,35 (**16**).

Por outro lado, a substituição do átomo de bromo por um grupo ciano (**6**), nitro (**7**) ou por uma metila (**8**), ou a sua presença na posição *para*, resultou em compostos com $IC_{50} < 10 \mu M$ contra o *T. cruzi*. Não foi possível estabelecer uma relação causal direta entre a atividade antiparasitária e os parâmetros eLogD e PAMPA. Porém, comparando-se os valores preditos para suas áreas de superfície polar (PSA, do inglês, *Polar Surface Area*), observa-se um aumento significativo (**6** = 90,8; **7** = 112,8; **8** = 90,8) em relação ao composto líder (PSA = 57,78). PSA é outro parâmetro físico-químico muito útil para a predição da permeabilidade de candidatos a fármacos e é definida como a soma da superfície dos átomos polares (oxigênio, nitrogênio e hidrogênios) presentes em uma molécula.

Dentre os análogos sintetizados, o inibidor mais potente **14** apresentou um valor de IC_{50} contra a cruzaina 4 vezes menor que o composto líder. Entretanto, este composto foi 10 vezes menos potente *in vitro* contra o parasita, o que pode ser explicado pelo aumento da lipofilia (eLogD = 4,35) e pela diminuição da permeabilidade (PAMPA = 0,34), em comparação com o líder (eLogD = 3,78 e PAMPA = 4,66).

O derivado N- acetilado **41** mostrou potência similar ao composto líder frente ao parasita. Surpreendentemente, o composto **38** (que contem o benzoxazol em vez do benzimidazol), com apenas 30% de inibição da enzima a 100 μM , apresentou potência substancial contra o parasita, com um valor de IC_{50} de 2,9 μM .

Este resultado sugere o efeito por meio de algum outro mecanismo, que não diretamente a inibição da cruzaina. Estudos complementares serão necessários para investigar essa questão. Em relação às propriedades físico-químicas, o composto **38** é superior ao composto líder quanto à permeabilidade (PSA = 64,36 e PAMPA = 24,20), fator intrinsecamente relacionado à biodisponibilidade.

4.1.3 Avaliação da pré-toxicidade dos derivados benzimidazólicos em camundongos

Os resultados positivos para essa série de compostos contra a enzima e o parasita conduziram a investigação do perfil de toxicidade. Para isso, alguns compostos representativos da série dos benzimidazóis, que demonstraram atividade contra o *T. cruzi*, foram submetidos a ensaios de toxicidade aguda em camundongos. Cada composto foi avaliado contra um camundongo BALB/c fêmea por via intraperitoneal (i.p.) seguindo protocolo validado pela OMS. Durante um período de 6 h, quatro doses foram administradas, resultando numa dose cumulativa de 150 mg/kg (**Tabela 6**). Os animais foram observados por 48 h. Camundongos tratados com os compostos **3, 6, 8, 12, 13, 21** e apresentaram alguns sinais de toxicidade após a última dose (**Tabela 7**).

Tabela 6 - Doses cumulativas dos compostos avaliados em camundongos.

Tempo (h)	Dose injetada (mg/kg)	Dose cumulativa (mg/kg)
0	20	20
2	30	50
4	50	100
6	50	150

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Toxicidade aguda dos compostos selecionados.^a

Composto/Tempo (h)	0	2	4	6	24	48
1	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	S	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	S,C	-	M
6	-	-	-	S,C	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	S,C	-	-
12	-	-	-	S,C	-	-
13	-	-	-	S	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	S	-	-
38	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	-

^aEnsaio *in vivo* com camundongos BALB/c. (-) Sem sinais de toxicidade aguda; (C) calafrios, (S) sede, (M) morte.

Fonte: Elaborada pela autora.

Entretanto, após 24 h esses sinais não foram mais observados. Os resultados indicaram que, de maneira geral, a série dos benzimidazóis é uma candidata, uma vez que sinais de toxicidade não foram observados. A exceção foi o composto **5** (que contém um átomo de iodo no anel fenila) que causou a morte do camundongo tratado após 48 h.

É importante destacar que esse é um estudo preliminar e envolveu o uso de somente um camundongo por composto, a fim de reduzir o número de animais utilizados nos testes. Conseqüentemente, os resultados de toxicidade não apresentam valor estatístico. Entretanto, são essenciais para a continuação dos estudos dessa série como candidatas a novos agentes antichagásicos.

4.1.4 Avaliação da toxicidade dos derivados benzimidazólicos em linhagem de células Vero

Os compostos **3**, **4**, **8**, **14**, **20**, e o composto líder foram avaliados em células Vero, uma linhagem celular isolada de células epiteliais de rim, extraídas do macaco verde africano (*Chlorocebus* sp.). Oito concentrações distintas de cada composto (900; 450; 225; 112,5; 56,25; 28,12; 14,06 e 7,03 μM) foram avaliadas. A **Tabela 8** apresenta os valores de IC_{50} determinados experimentalmente.

Tabela 8 - Resultados da avaliação de proliferação celular.^a

Composto	IC_{50} (μM) Células Vero	IC_{50} (μM) <i>T. cruzi</i>	Índice de seletividade (SI)
1	253,3 \pm 1,0	1,6 \pm 0,6	158
3	144,5 \pm 1,0	> 100	> 1,4
4	193,9 \pm 1,1	> 100	> 1,9
8	184,9 \pm 1,0	2,8 \pm 0,7	66
14	132,74 \pm 1,1	16,2 \pm 3,5	8
20	247,0 \pm 1,0	34,6 \pm 2,6	7

^aOs valores são as médias de três ensaios independentes, realizados em triplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Entre os compostos avaliados em células Vero, destacamos os compostos **1**, **8**, **21** e **15** que apresentaram valores de IC_{50} consideravelmente mais altos quando comparados aos valores do parasita. A partir desses resultados, o índice de seletividade (IS) foi determinado (**Tabela 8**). Destaque para os compostos **1** e **8**, que apresentam expressivo IS. Esse é mais um dado referente a segurança dos derivados benzimidazólicos, uma vez que uma boa seletividade garante uma melhor integridade das células saudáveis.

4.1.5 Planejamento e ensaios bioquímicos de novos análogos do composto líder 1 – avaliação do benzimidazol

Os resultados obtidos para a série de derivados benzimidazólicos (análogos do composto líder **1**) estão reunidos em um trabalho publicado na revista *Journal of Medicinal Chemistry*. Esse manuscrito foi escolhido pelos editores para ilustrar a capa da revista.

Com base nesse conjunto de dados, o planejamento de novos análogos teve continuidade com o objetivo de explorar essa classe química com foco em potência, afinidade e mecanismo de ação. Desse modo, novos compostos *N*-substituídos (benzimidazol) foram planejados para promover interações com os subsítios S1' e S1 (**Figura 18**).

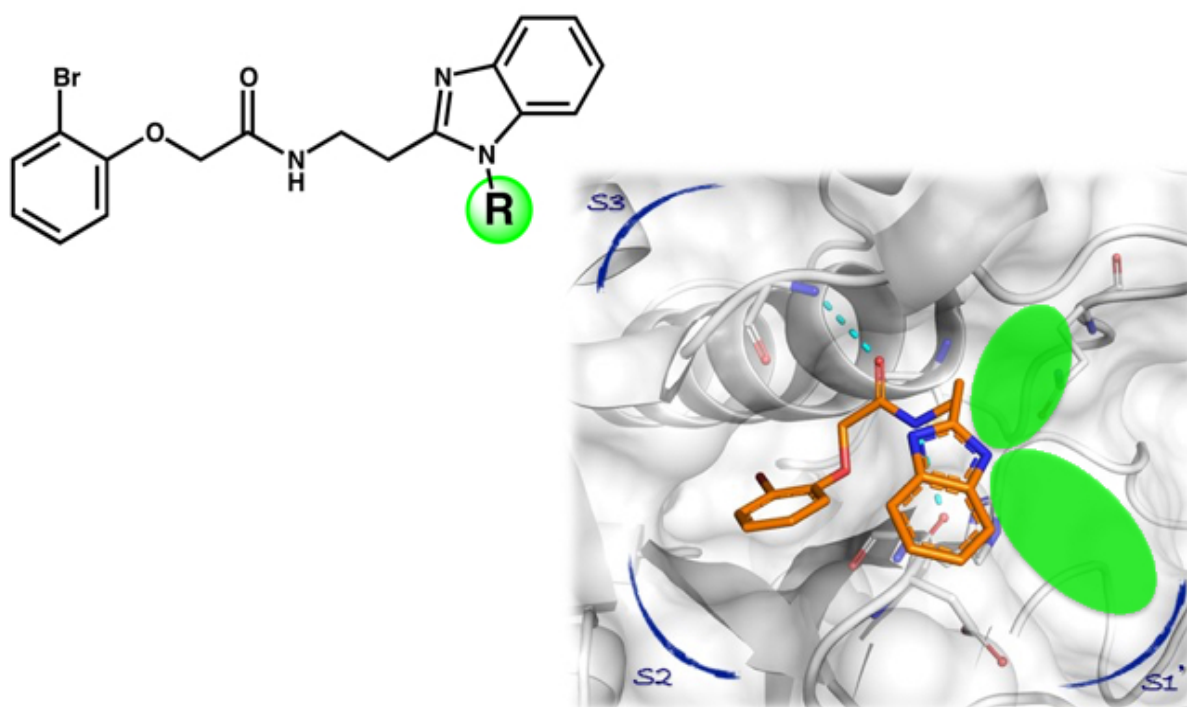


Figura 18 - Racional para a *N*-substituição no benzimidazol (grupo R representado no composto líder) explorando os subsítios S1 e S1' (destaque em verde a partir da conformação cristalográfica do composto líder **1**).

Fonte: Elaborada pela autora.

As estruturas dos compostos planejados e os resultados obtidos para o ensaio de inibição da cruzaina foram reunidos e são apresentados na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Estruturas e inibição da cruzaina dos compostos *N*-substituídos benzimidazólicos.^a

Composto	Estrutura	% Inibição (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M) ^b
46		72,1	ND
47		91,7	1,04 \pm 1,07
48		75,9	1,69 \pm 0,4
49		36,0	ND
50		49,6	ND
51		80,7	2,2 \pm 1,2

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Para descartar a possibilidade de inibição por agregação do ligante, o ensaio de inibição foi realizado com diferentes concentrações de Triton X-100 (0%, 0,01% e 0,1%) no tampão de ensaio, lembrando que a concentração padrão, conforme descrito na sub-sessão 3.5 foi de 0,01%. A concentração final de cada composto no ensaio foi de 100 μM e as demais condições estão descritas no sub-item 3.5 da metodologia. Os resultados são mostrados na **Tabela 10** e, como podemos observar, não há alteração significativa dos valores obtidos quando as três condições de teste são comparadas.

Tabela 10 - Ensaio de sensibilidade ao detergente Triton X100 na inibição da cruzaina.^a

Composto	0% Triton	0,01% Triton	0,1% Triton
46	73,4 \pm 2,5	72,1 \pm 1,7	77,5 \pm 2,2
47	95,2 \pm 0,6	95,9 \pm 1,7	96,0 \pm 1,1
48	80,3 \pm 1,4	85,5 \pm 2,3	84,6 \pm 1,3
50	52,1 \pm 1,3	53,2 \pm 1,9	55,5 \pm 5,2
51	87,9 \pm 0,7	82,6 \pm 0,3	82,9 \pm 3,5

^aO valor de % de inibição são referentes a média de 3 medidas.

Fonte: Elaborada pela autora.

O mecanismo de inibição dos compostos mais potentes (**47** e **51**) foi determinado por sucessivas medidas da atividade enzimática com diversas concentrações de substrato e inibidor. Os resultados são apresentados no gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk (**Figuras 19 e 20**).

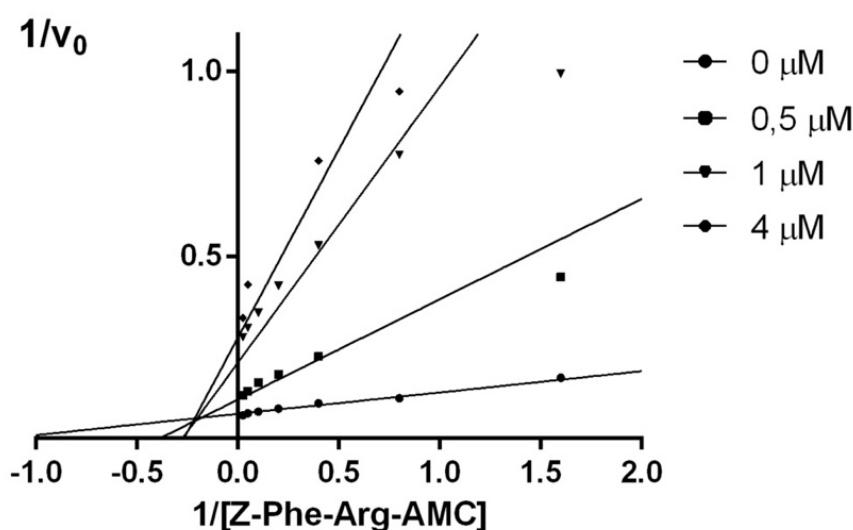


Figura 19 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o composto 47.

Fonte: Elaborada pela autora.

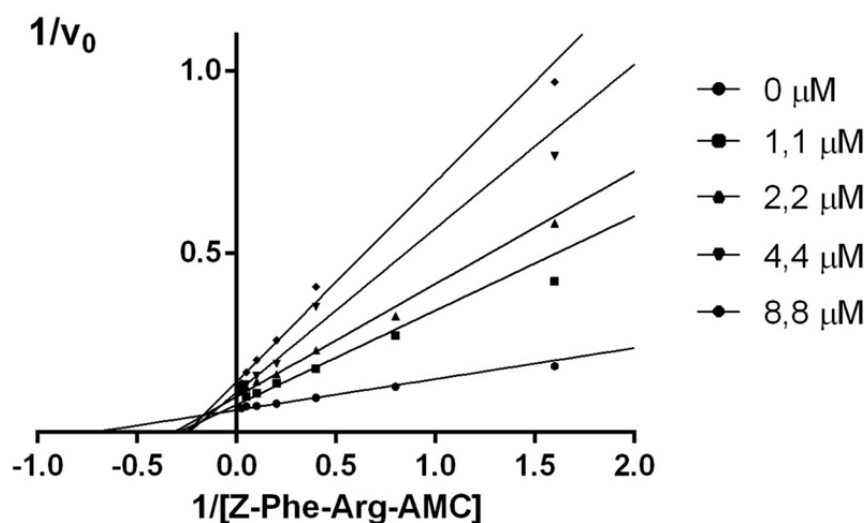


Figura 20 - Gráfico de Lineweaver-Burk para o composto **51**.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em contraste ao mecanismo de inibição do tipo competitivo identificado para os demais compostos da série dos benzimidazóis (descritos até o momento), os compostos **47** e **51** apresentaram um comportamento distinto, caracterizado por um mecanismo de inibição do tipo não-competitivo, com maior afinidade pela enzima livre (**Figuras 19 e 20**).

Tabela 11 - Confirmação do mecanismo do tipo não-competitivo dos compostos **47** e **51**.^a

47	
[S] (μM)	IC_{50} (μM) ^a
2,5	$0,5 \pm 1,3$
5	$0,4 \pm 1,2$
10	$1,0 \pm 1,5$
15	$0,8 \pm 1,7$
20	$0,3 \pm 1,5$
30	$0,5 \pm 1,2$
51	
[S] (μM)	IC_{50} (μM) ^a
2,5	$1,7 \pm 1,3$
5	$2,2 \pm 1,3$
10	$2,2 \pm 1,1$
15	$1,9 \pm 1,8$
20	$2,5 \pm 1,2$

^aOs valores de IC_{50} foram determinados independentemente pela medida em triplicada para pelo menos 6 concentrações do inibidor. Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

O comportamento típico de um inibidor não-competitivo foi também confirmado em outro experimento, no qual foi determinado o efeito da variação dos valores de IC_{50} na presença de concentrações crescentes de substrato, mantendo-se fixa a concentração de

enzima. Os resultados, apresentados na **Tabela 11**, mostram que não há variação significativa nos valores de IC_{50} para os compostos **47** e **51**, o que está de acordo com o mecanismo de inibição estudado.

4.1.6 Planejamento e avaliação bioquímica de novos compostos benzimidazólicos *N*-substituídos - investigação do efeito da modificação molecular no mecanismo de inibição

Tabela 12 - Estruturas e inibição da cruzaina para os novos derivados benzimidazólicos *N*-substituídos.^a

Composto	Estrutura	% Inibição (100 μ M) ^a	IC_{50} (μ M) ^b	K_i (μ M)
11		90,0	10,9 \pm 1,0	ND
52		87,0	8,6 \pm 1,7	8,0
53		77,6	1,1 \pm 0,2	3,2
54		78,8	13,7 \pm 1,4	5,6
55		81,6	12,1 \pm 2,4	ND
56		79,5	8,6 \pm 2,6	ND
57		78,8	8,8 \pm 1,8	ND

^aOs valores de % de inibição da tabela são referentes a média de 3 medidas experimentais. ^bOs valores de IC_{50} foram determinados independentemente pelas medidas em triplicada de pelo menos 6 concentrações diferentes de inibidor. Os ensaios foram realizados em 2-3 experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para investigar o papel da modificação molecular no mecanismo de inibição dos inibidores em decorrência da *N*-substituição do benzimidazol, novos compostos foram planejados, sintetizados e avaliados. Inicialmente, o objetivo foi avaliar o crescimento do ligante no sítio a partir do *N*-substituinte H. Na sequência, o volume do substituinte foi

variado, causando uma maior ocupação do sítio. As estruturas e os valores referentes a inibição da enzima são apresentados na **Tabela 12**.

Os resultados obtidos indicam que, ainda que a potência não seja comparável com a do composto líder ($IC_{50} = 0,8 \mu\text{M}$), esses compostos apresentaram potência inibitória considerável. O próximo passo foi a determinação do mecanismo de inibição (**Figura 21**). Os resultados dos gráficos de *Lineweaver-Burk* indicam que os compostos **11** e **52** são inibidores do tipo competitivo. Por outro lado, **53** e **54** apresentam mecanismo do tipo não-competitivo.

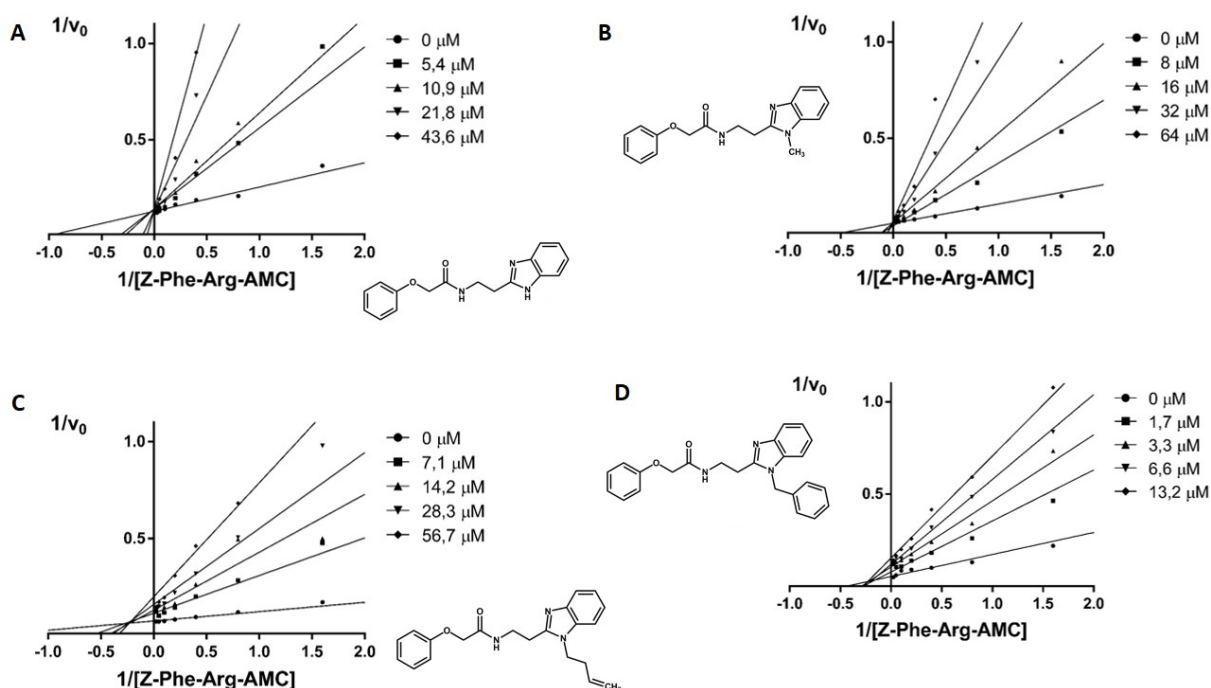


Figura 21 - Gráfico de *Lineweaver-Burk* e estrutura química dos compostos A) **11**; B) **52**; C) **54**; D) **53**.
Fonte: Elaborada pela autora.

O mecanismo não-competitivo dos compostos **53** e **54** foi corroborado pela determinação de valores de IC_{50} em diferentes concentrações de substrato, mantendo-se fixa a concentração da proteína. É possível observar que não há variação no valor do IC_{50} determinado (**Tabela 13**), o que confirma o resultado obtido pela análise do gráfico de *Lineweaver-Burk* (**Figura 21**). Estes resultados indicam claramente a influência do N-substituinte do anel benzimidazol no modo de ação dos inibidores.

A importância do grupo NH nesse sistema já havia sido identificada. A simples substituição do NH por um átomo de oxigênio (**composto 38, Tabela 3**) resultou na completa perda da atividade de inibição da cruzaina. Além disso, o conjunto de derivados N-substituídos distintos avaliado permitiu o estabelecimento de uma relação clara entre o

volume molecular e o mecanismo de inibição envolvido. A ausência do substituinte (**11**) ou a presença de um substituinte pouco volumoso, como uma metila (**52**), resultaram em um mecanismo do tipo competitivo. Em compensação, a *N*-substituição por grupamentos volumosos, como o etilbenzeno (**53**) ou o 1-penteno (**54**), levou a alteração do mecanismo para a modalidade não-competitiva. Estudos cristalográficos para elucidação das estruturas e interações entre estas moléculas e a cruzaina estão em andamento no nosso laboratório em colaboração com o Professor Glaucius Oliva.

Tabela 13 - Confirmação do mecanismo do tipo não-competitivo dos compostos **53** e **54**.^a

Composto 53	
[S] (μM)	IC ₅₀ (μM) ^a
2,5	1,6 \pm 0,1
5	1,8 \pm 0,1
10	1,9 \pm 0,2
15	1,4 \pm 0,5
20	2,4 \pm 0,9
40	1,2 \pm 0,5
80	3,0 \pm 0,9
Composto 54	
[S] (μM)	IC ₅₀ (μM) ^a
2,5	12,4 \pm 2,2
5	7,5 \pm 1,2
10	14,7 \pm 1,8
15	11,2 \pm 1,5
20	10,2 \pm 1,5
40	8,9 \pm 3,1

^aOs valores de IC₅₀ foram determinados independentemente pela medida em triplicada para pelo menos 6 concentrações do inibidor. Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.7 Avaliação da atividade antiparasitária dos derivados *N*-substituídos benzimidazólicos

Após a caracterização das propriedades inibitórias frente a enzima alvo, esse conjunto de compostos foi submetido a avaliação biológica em culturas celulares infectadas pelo *T. cruzi*. Os valores de IC₅₀ obtidos são apresentados na **Tabela 14**. Os resultados evidenciaram a boa atividade contra o parasita. Os compostos **47** (IC₅₀ = 2,04 \pm 0,6 μM) e **51** (IC₅₀ = 1,43 \pm 0,4 μM) apresentam potência comparável ao fármaco benznidazol (IC₅₀ = 1,45 \pm 0,4 μM).

O único composto inativo desta série foi o **52**. Em relação as propriedades físico-químicas, uma singular diferença é a redução da lipofilia, como pode ser observado pelos

valores de $e\text{Log}D$ (2,93) e $\text{Log}P$ (2,61). Esses parâmetros são relacionados a permeabilidade, uma propriedade essencial para que o composto atinja o seu alvo intracelular.

Tabela 14 - Atividade *in vitro* e propriedades físico-químicas de derivados *N*-substituídos benzimidazólicos contra o *T. cruzi* (forma amastigota).

Composto	Estrutura	IC ₅₀ (μM) ^a	PAMPA	eLogD	LogP	PSA
BZ		1,45 ± 0,4	3,17	0,84	1,00	92,70
47		2,04 ± 0,6	4,30	4,24	1,57	104,38
51		1,43 ± 0,4	2,29	4,45	4,31	65,38
52		≈ 100	1,46	2,93	2,62	56,15
53		7,4 ± 2	8,72	4,06	4,20	56,15
54		6,9 ± 2,2	9,06	3,75	3,56	56,15

^aOs valores de IC₅₀ contra o *T. cruzi* (cepa Tulahuen, ensaio *in vitro*) representam as médias de pelo menos 3 experimentos individuais. BZ = benzimidazol. Valores de $e\text{Log}D$ e PAMPA foram determinados experimentalmente. $\text{Log}P$ e PSA foram preditos computacionalmente.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.8 Planejamento e ensaios bioquímicos de derivados do composto líder 1 – avaliação do papel da fenila

A fenila presente nessa série de compostos ocupa o bolsão S2 do sítio ativo da Cruzaína, onde encontra-se também o resíduo Glu208. Dessa forma, foram planejados, sintetizados e avaliados, novos compostos com grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio na fenila. O objetivo era explorar uma possível interação com o Glu208. A estrutura dos compostos e as propriedades inibitórias contra a cruzaína são mostradas na

Tabela 15.

Tabela 15 - Estrutura e propriedades inibitórias de derivados benzimidazólicos com substituições na fenila.^a

Composto	Estrutura	% Inibição da cruzaina (100 μ M) ^a		IC ₅₀ (μ M) ^b
		sem incubação	10 min incubação	
58		57,7	79,5	4,5 \pm 0,5
59		8,6	20,5	ND
60		17,6	38,6	ND
61		45,9	74,9	ND
62		69,7	87,0	ND
63		90,0	90,0	3,4 \pm 0,9
64		70,0	70,2	28,1 \pm 3,1
65		95,0	96,0	2,7 \pm 0,7
66		81,0	100,0	2,3 \pm 0,6
67		84,0	89,0	24,2 \pm 4,5
68		82,0	83,0	13,5 \pm 2,6
69		73,0	90,0	18,2 \pm 1,8
70		92,0	92,0	8,3 \pm 2,1
71		59,0	62,0	ND
72		43,0	58,0	ND

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados demonstram as boas propriedades inibitórias dos compostos contra a enzima cruzaina. Os compostos mais potentes **63** ($IC_{50} = 3,4 \pm 0,9 \mu M$), **65** ($IC_{50} = 2,7 \pm 0,7 \mu M$) e **66** ($IC_{50} = 2,3 \pm 0,6 \mu M$), apresentam uma naftila com uma hidroxila ou um éter nas posições *meta* ou *para*. O composto **58** apresenta uma amida na posição *para* da fenila, dando origem a outro composto com potência micromolar ($IC_{50} = 4,5 \pm 0,5 \mu M$). A **Figura 22** apresenta o padrão predito de interação dos substituintes da fenila com o Glu208 para **63**, **65** e **68**.

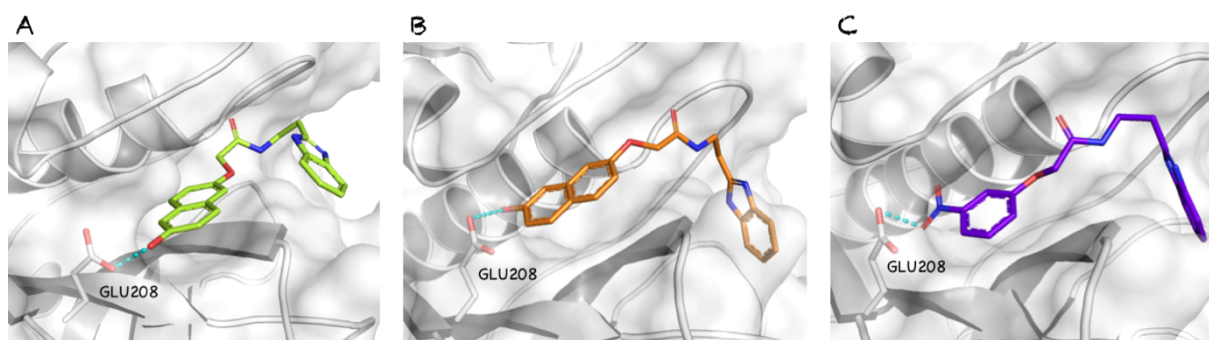


Figura 22 - Representação da interação dos substituintes no anel fenil com o Glu208. A) **63**. B) **65**. C) **68**.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.9 Ensaio de citotoxicidade e determinação do índice de seletividade

Nesse trabalho, o índice de seletividade (IS) foi expresso pela razão entre os valores de IC_{50} de um composto para uma linhagem celular humana saudável e para o parasita. Os fibroblastos HFF1 foram empregados como linhagem de células humanas saudáveis. Os resultados são mostrados na **Tabela 16** e na **Figura 23**.

Os derivados benzimidazólicos dessa série apresentam um bom IS. Três compostos apresentaram IS comparável ou superior ao **BZ**: **3** ($IS > 61$), **8** ($IS > 35$) e **38** ($IS > 34$). Apenas quatro compostos apresentaram valores de IS abaixo de >10 : **14** (> 2), **15** (> 2), **40** (> 9) e **62** (> 2).

A **Figura 23** mostra a porcentagem de células vivas a medida que a concentração do composto teste é aumentada de 11 para 100 μM . Com as exceções do **14**, **47** e **51**, que causaram uma redução significativa de células viáveis em concentrações do composto superiores a 33 μM , os demais compostos mantiveram a quantidade de células vivas entre 80 e 100 %, mesmo em concentrações altas da ordem de 100 μM . Destacam-se os compostos **1**, **8**, **53**, **54**, e **62** que mantiveram um % superior de células vivas quando comparados ao BZ.

Esse resultado foi muito animador no que diz respeito a otimização de novos derivados candidatos a fármacos.

Tabela 16 - Avaliação biológica de derivados benzimidazóis contra o *T.cruzi* (forma amastigota) e culturas celulares de HFF1.

Composto	IC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM) ^a	IC ₅₀ HFF1 (μM) ^b	IS ^c
BZ	3,00 ± 0,60	> 100	> 33
1	1,63 ± 0,57	> 100	> 61
7	7,90 ± 2,13	> 100	> 12
8	2,81 ± 0,75	> 100	> 35
13	6,68 ± 2,35	> 100	> 15
14	16,22 ± 3,51	> 30	> 2
15	46,12 ± 6,21	> 100	> 2
38	2,90 ± 0,66	> 100	> 35
40	11,14 ± 3,19	> 100	> 9
47	2,04 ± 0,60	> 30	> 14
51	1,43 ± 0,40	> 30	> 21
53	7,40 ± 2,00	> 100	> 13
54	6,90 ± 2,20	> 100	> 14
62	~ 50,00	> 100	> 2

^aEnsaio de viabilidade de *T. cruzi* (amastigota). Os dados representam as médias ± DP (desvio padrão) de três medidas.

^bEnsaio de citotoxicidade. Os dados representam as médias ± DP de dois experimentos independentes em triplicata. ^cÍndice de seletividade = IC₅₀ *T. cruzi* / IC₅₀ HFF1.

Fonte: Elaborada pela autora.

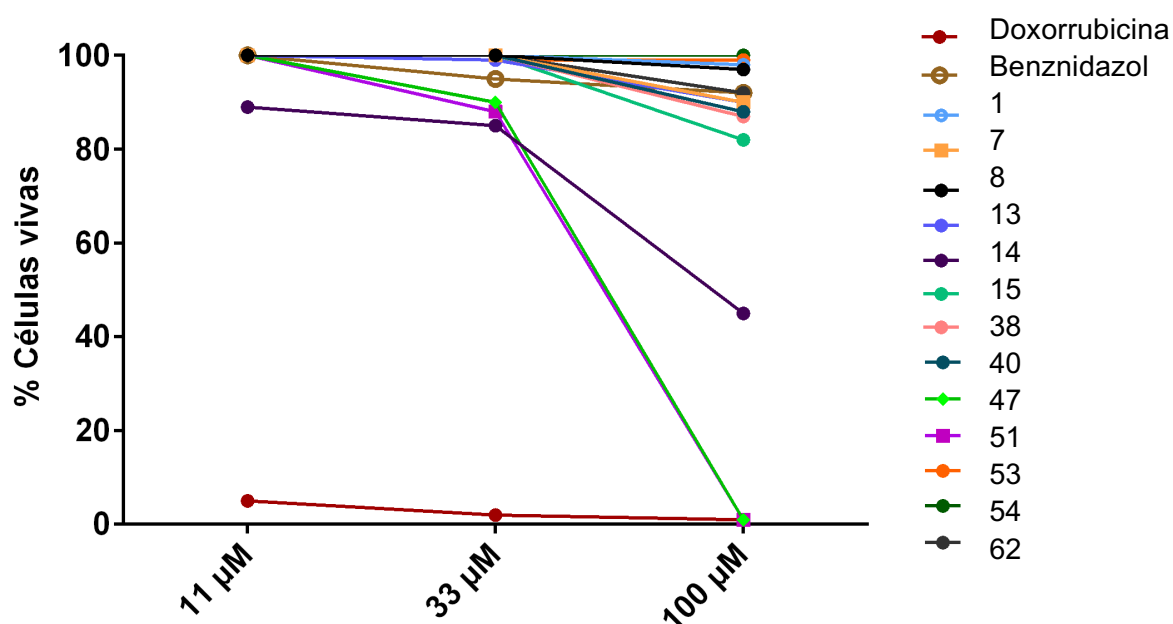


Figura 23 - Avaliação da citotoxicidade de compostos representativos da série de derivados benzimidazóis. Controles: positivo (doxorrubicina) e negativo (benznidazol) em células da linhagem HFF1 de fibroblastos humanos saudáveis.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Estudos farmacocinéticos e de metabolismo

A estratégia utilizada nesse trabalho de tese para a identificação de novos candidatos a antichagásicos envolveu o planejamento de inibidores da enzima cruzaina usando métodos de SBDD e LBDD. Essas etapas de otimização molecular tiveram como base a melhoria da potência dos compostos contra a cruzaina e o *T. cruzi*.

Entretanto, um passo importante a frente seria a incorporação da otimização do perfil farmacocinético dos compostos. Para que um projeto de descoberta de um novo fármaco seja bem sucedido, o ideal seria a otimização em paralelo de ambos parâmetros (farmacodinâmica e farmacocinética). A estratégia de otimização múltipla de parâmetros (MPO, do inglês, *Multi Parametric Optimization*) incorpora a ideia de análise integrada de propriedades para que seja alcançada uma dose terapêutica mínima, levando à diminuição dos efeitos adversos causados pelo uso do fármaco.

O emprego dessa metodologia inovadora nesse trabalho de tese de doutorado foi possível por meio de um estágio sanduíche de um ano realizado no departamento de metabolismo e farmacocinética da empresa farmacêutica AbbVie (Chicago, IL, Estados Unidos). Esse estágio foi viabilizado com uma bolsa de estudos BEPE da FAPESP (processo número: 2014/26324-0). Os resultados experimentais coletados para as séries de derivados benzimidazólicos e imídicos serão discutidos nos subitens seguintes.

4.2.1 Determinação *in vitro* de parâmetros farmacocinéticos para os derivados benzimidazólicos utilizando microsomas de fígado

Microsomas podem ser obtidos a partir de diferentes tecidos, mais comumente do fígado de animais e doadores humanos, por meio de ultra-centrifugação. Desta forma, microsomas de fígado humano (HLM, do termo em inglês para *Human Liver Microsomes*) têm se tornado um modelo *in vitro* comumente e amplamente utilizado. A atividade enzimática é estável durante períodos longos de armazenamento. Afim de refletir a proporção padrão de enzimas presentes no fígado de animais ou de humanos, microsomas de diferentes doadores são agrupados. A partir da suplementação dos microsomas com diferentes cofatores e reagentes, é possível investigar e fazer a distinção entre enzimas pertencentes à família do citocromo P450 (CYPs), monooxigenases dependentes de flavina (FMOs), glucuronosiltransferases (UGTs) e suas atividades. Pela relativa facilidade de obtenção das

enzimas e escalabilidade, este modelo é amplamente utilizado pela indústria farmacêutica para a predição do *clearance in vivo* de novas entidades químicas (NCEs).

O objetivo da triagem de propriedades relacionadas a estabilidade metabólica é estimar a susceptibilidade de um composto químico à biotransformação. Antes da realização deste ensaio, a pureza (preferencialmente acima de 90%), estabilidade e solubilidade (preferencialmente acima de 10 μM) do inibidor deve ser determinada. A estabilidade metabólica é então determinada com base no desaparecimento do composto teste durante a sua incubação com os microsomos, sendo expressa como meia vida *in vitro* ($T_{1/2}$) e *clearance* intrínseco (CL_{int}). Com base nestes valores, parâmetros farmacocinéticos secundários, como *clearance* hepático, biodisponibilidade e meia vida *in vivo* podem ser calculados. Se um composto é rapidamente metabolizado, sua biodisponibilidade *in vivo* provavelmente será baixa. Por isso, somente compostos com propriedades farmacocinéticas adequadas são escolhidos para avançar em direção a estágios mais avançados do desenvolvimento de fármacos.

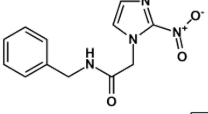
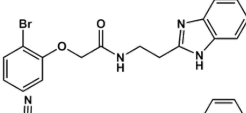
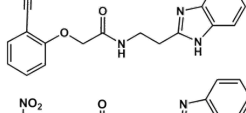
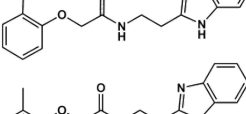
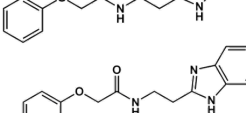
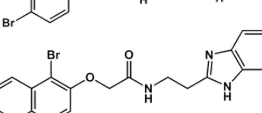
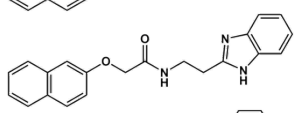
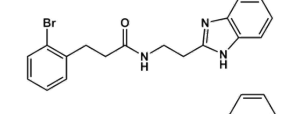
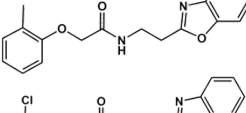
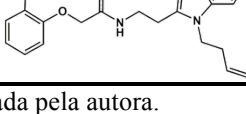
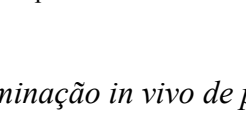
Neste trabalho, os compostos foram incubados com microsomos de fígado (humano e camundongo) em placas de 96 poços. Amostras foram coletadas de hora em hora, durante um período total de seis horas, para detecção do composto original remanescente utilizando-se espectrometria de massas (LC-MS/MS, da sigla em inglês para *Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry*). Os dados obtidos foram utilizados para determinação da meia vida e *clearance* intrínseco (CL_{int}) dos compostos teste.

Como ponto de partida para a determinação do perfil farmacocinético dos compostos, dez moléculas da série dos benzimidazóis foram selecionadas a partir dos dados de potência (IC_{50}) contra a cruzaina e o *T. cruzi*. Na **Tabela 17** são apresentados os resultados para a determinação do *clearance* intrínseco utilizando-se microsossomos de três espécies distintas (humano, rato e camundongo). Também a fração de composto livre (**fu**, do inglês, *fraction unbound*), quando da sua incubação com microsossomos, e os valores de *clearance*, considerando-se o fator de correção **fu**.

Importante destacar que para a discussão dos resultados ao longo de toda essa tese, foram considerados somente os valores de *clearance* corrigidos para **fu** ($CL_{\text{int_u}}$, resultante da divisão do valor de CL_{int} pelo valor de **fu** do respectivo composto).

Os valores de eLogD e PAMPA foram apresentados nos subitens **4.1.2** e **4.1.7** (**Tabelas 5** e **14**), durante a discussão dos resultados contra o *T. cruzi*. Os mesmos foram incluídos novamente na **Tabela 17** para facilitar a visualização e a discussão dos resultados.

Tabela 17 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.

Composto	Estrutura	CL _{int} (L/h/kg) Humano	CL _{int} (L/h/kg) Camundongo	fu	CL _{int_u} (L/h/kg) Humano	CL _{int_u} (L/h/kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
BZ		1,5	4,4	1,0	1,5	4,4	0,8	3,2
1		9,2	191,0	0,6	16,0	334,5	3,9	5,6
6		5,6	74,6	0,9	6,6	87,9	2,6	2,2
7		25,5	526,0	0,7	39,2	808,0	3,6	4,9
8		23,9	300,0	0,8	31,2	392,2	3,6	5,9
13		10,4	161,0	0,8	12,5	193,3	2,8	0,7
14		49,9	607,0	0,1	539,5	6562,2	4,4	0,3
15		21,1	565,0	0,5	43,9	1174,6	3,9	0,7
20		28,8	705,0	0,8	38,2	935,0	3,8	4,7
38		22,9	745,0	0,9	26,9	874,4	3,9	19,7
40		230,0	934,0	0,5	501,1	2034,9	4,1	7,7

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.2 Determinação *in vivo* de parâmetros farmacocinéticos utilizando camundongos

A **Tabela 18** mostra o perfil farmacocinético *in vivo* em camundongos para o mesmo conjunto de compostos apresentado na **Tabela 17**. A partir desse experimento, informações como a meia-vida ($t_{1/2}$), *clearance* (CL_p) e a biodisponibilidade (F), foram determinados.

4.2.3 Correlação *in vitro* x *in vivo* (IVIVC)

Após a realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo* (IVIV) para a avaliação da estabilidade metabólica dos compostos (resultados apresentados nas **Tabelas 17 e 18**), verificou-se uma excelente correlação (IVIVC) para os valores de *clearance* quando a correção para a fração de composto livre é considerada (**Figura 24**). Entretanto, ainda há um bom caminho para que seja alcançado o espaço definido como fármaco-similar (do inglês, *drug-like space*), onde idealmente os compostos devem apresentar valores de *clearance* menores do que 10 L/h/kg. A excelente correlação observada entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* permite utilizar de maneira confiável os experimentos *in vitro*. Esses são mais rápidos e apresentam menor custo para a predição da estabilidade dos compostos *in vivo*, bem como para a priorização de compostos para estudos posteriores *in vivo*.

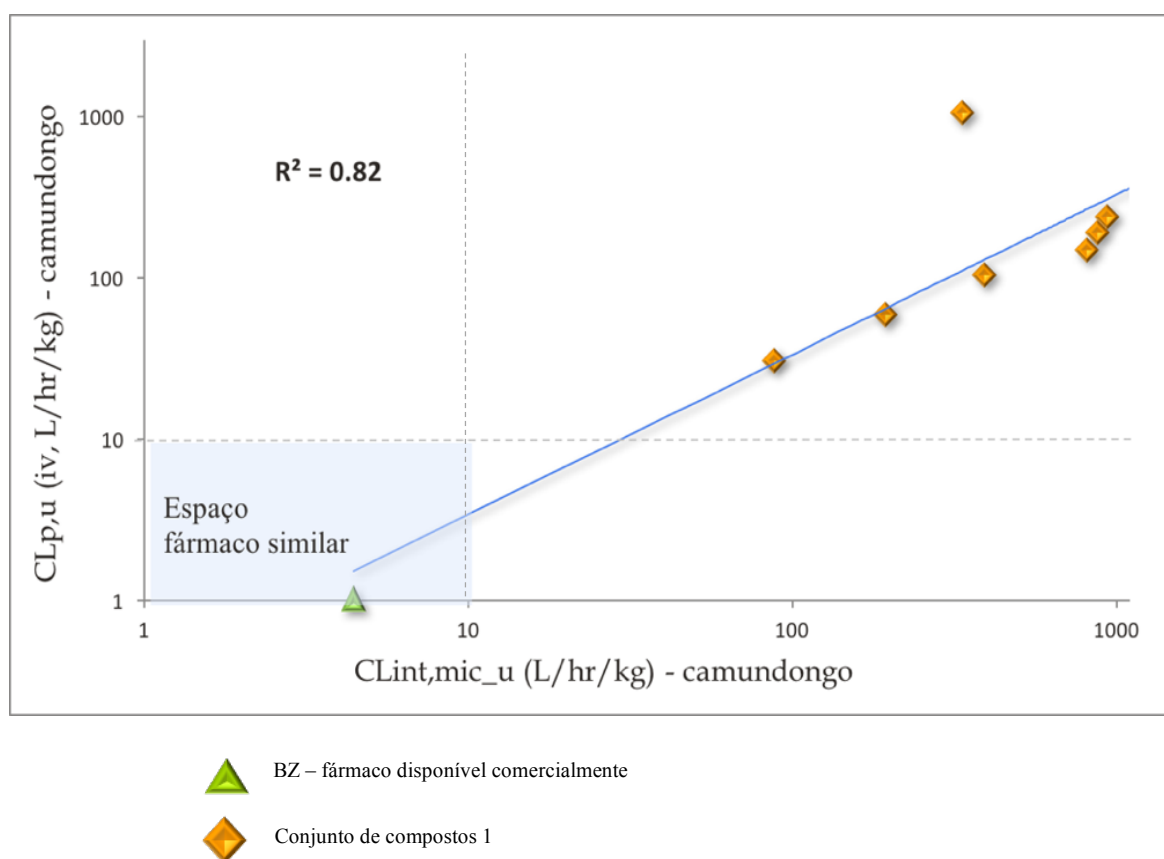


Figura 24 - *Clearance_u* IVIVC – boa correlação, mas ainda afastado do espaço fármaco-similar.
 Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 18. Estrutura e perfil farmacocinético *in vivo* de derivados benzimidazólicos, utilizando-se camundongos.

Composto	Estrutura	Via intra-venosa						Via oral					
		t _{1/2} (h)	C ₀ (ng/mL)	V _{SS} (L/kg)	AUC (ng#h/mL)	CLp (L/h/kg)	fu	CLP ₀ (L/h/kg)	t _{1/2} (h)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC (ng#h/mL)	F (%)
BZ		0,8	961	1,1	1.020	1,0	0,99	1,0	1,5	404	0,4	1.040	90
1		0,2	283	1,8	84	3,2	0,03	103,7	-	-	0,3	1,0	1,2
9		0,5	153	4,4	83	6,3	0,06	104,3	-	0,0	-	0,0	0,0
21		0,5	144	7,2	55	9,5	0,04	231,5	-	0,0	-	0,0	0,0
39		0,2	169	2,4	53	9,5	0,05	187,1	-	14,6	0,3	-	-
7		0,2	232	1,9	67	4,6	0,15	29,9	-	12,8	0,3	-	-
15		0,3	255	1,9	116	7,6	0,00	2.874,7	0,6	7,6	0,3	6,5	5,6
41		0,4	126	3,3	82	6,2	0,01	430,5	-	2,5	0,3	-	-
8		0,2	220	2,5	53	5,9	0,04	157,4	-	-	0,3	1,0	1,9
14		0,2	658	0,6	160	9,5	0,16	60,6	0,4	71,7	0,3	56,5	35,2
16		0,2	228	2,0	86	5,8	0,02	334,6	0,2	3,7	0,3	1,7	2,0

Fonte: elaborada pela autora.

4.2.4 Determinação da estabilidade dos compostos, utilizando-se hepatócitos humanos

Entender as vias de eliminação de compostos teste do organismo é essencial para compreender os níveis de exposição e para a predição da dose efetiva. Hepatócitos apresentam todas as enzimas responsáveis pelo metabolismo de fármacos encontradas no fígado, incluindo metabolismo de Fase I e Fase II.

Os resultados das **Tabelas 17 e 18** indicam que todos os compostos avaliados possuem valores elevados de *clearance* total, da ordem de 60 a 180 % do fluxo sanguíneo do fígado de um camundongo (5,4 L/h/kg), uma explicação plausível para a baixa biodisponibilidade (valores de **F** entre 0 e 35 %, **Tabela 18**).

Para identificar e melhor compreender a(s) via(s) de eliminação desses compostos, experimentos para analisar a estabilidade foram conduzidos por meio da incubação dos compostos em culturas de hepatócitos humanos. Destaca-se que essas culturas contêm o conjunto completo de enzimas hepáticas do metabolismo humano de fármacos. Os experimentos foram conduzidos na ausência de inibidores, com adição apenas do composto teste, para a determinação do *clearance* total (Fase I + Fase II). O composto 1-ABT, inibidor de todas as isoformas da família CYP450, principais responsáveis pelo metabolismo de Fase I, foi utilizado para a identificação da fração de composto teste metabolizada pelas demais enzimas da Fase I, bem como pelas enzimas conjugadoras da Fase II.

Testes adicionais foram realizados na presença do composto azamulin, um inibidor da CYP3A4. Esses ensaios foram realizados para a identificação da fração de composto metabolizada especificamente por essa isoforma, que é a responsável pelo metabolismo da maioria dos fármacos disponíveis na clínica médica. Consequentemente, a CYP3A4 tem um papel central nas interações do tipo fármaco-fármaco (**DDI**, do inglês, *drug-drug interactions*), que estão fortemente relacionadas aos efeitos adversos e a baixa eficácia quando dois ou mais fármacos são administrados simultaneamente.

Os resultados são representados graficamente na **Figura 25**. O metabolismo de Fase I executado pelas enzimas da família CYP450 foi responsável por 56 a 95 % do metabolismo dos compostos (média de $78,1 \pm 12,9$ %). A contribuição das demais enzimas da Fase I e das enzimas da Fase II para o *clearance* das moléculas foi inferior, com valores entre 5 e 35 % do *clearance* total (média de $21,9 \pm 13,6$ %).

Os resultados indicam que a principal rota de eliminação dos compostos do organismo humano é o metabolismo realizado pelo sistema CYP450. Fica evidente que a CYP3A4 tem

um papel fundamental, uma vez que na presença de seu inibidor azamulin, os valores de *clearance* foram em média 40 % menores (mínimo de 31,6 % e máximo de 59,5 %), quando comparados aos valores de *clearance* total (valores correspondentes as barras vermelhas e azuis da **Figura 25**, respectivamente).

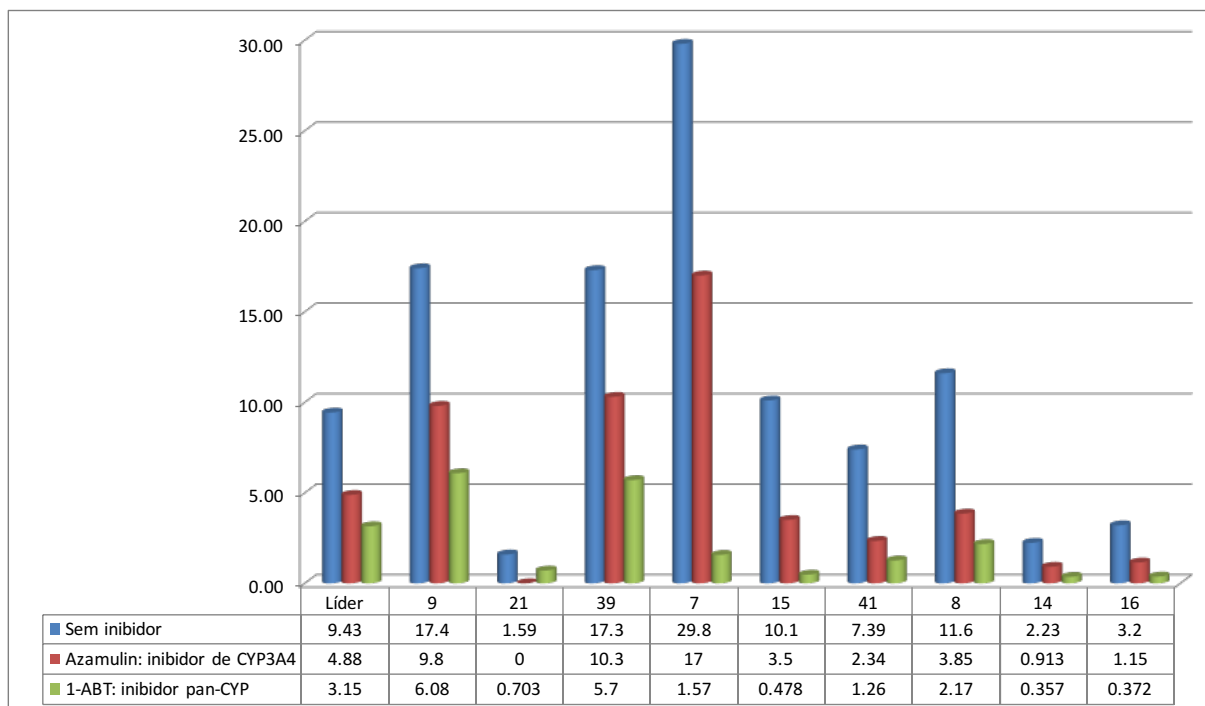


Figura 25 - Estabilidade dos compostos avaliada após incubação com hepatócitos humanos e representada como valores de *clearance*. *Clearance* total indicado pelas barras azuis. *Clearance* remanescente após incubação com azamulina, inibidor de CYP3A4 (barras vermelhas). *Clearance* residual após incubação com 1-ABT, inibidor de todas as isoformas CYP é indicado pelas barras verdes.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.5 Identificação das isoformas da CYP450 envolvidas no metabolismo dos derivados benzimidazólicos

Citocromos P450 (CYPs) são uma família de isozimas responsáveis pela biotransformação de diversos fármacos. O metabolismo de fármacos por meio deste sistema emergiu como um importante determinante na ocorrência de diversas interações medicamentosas responsáveis por toxidez, efeito farmacológico reduzido e efeitos adversos. Reconhecer se os fármacos atuam como substratos, indutores ou inibidores das CYPs, já nos estágios iniciais de seu descobrimento, pode evitar a ocorrência de interações medicamentosas indesejáveis quando estes são administrados na clínica.





















A identificação de suas isoformas e de diversos fármacos que se associam a cada uma delas, tem permitido um grau maior de predição destas interações. Seis isoformas distintas – CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 – com papéis importantes no metabolismo de fármacos, foram identificadas. Elas são responsáveis pelo metabolismo de cerca de 90% dos fármacos disponíveis no mercado e, dentre estes 90%, a CYP3A4 sozinha metaboliza em média 50%. De fato, o metabolismo compartilhado por CYP3A4 tem resultado em diversas interações fármaco-fármaco importantes e informações adicionais sobre os efeitos de fármacos na biotransformação mediada por enzimas levou a identificação de inibidores e indutores enzimáticos, proporcionando um conhecimento ainda maior sobre a natureza destas interações.

O ensaio de fenotipagem utilizando enzimas CYP recombinantes permite a identificação da isoforma envolvida no metabolismo de determinado composto. Sabe-se, por exemplo, que compostos eliminados do organismo por diversas vias alternativas tem seu potencial como vítima de interação fármaco-fármaco reduzido.

O experimento descrito no item **4.2.4** demonstrou que o metabolismo dos compostos se deu principalmente pela Fase I, mais especificamente, pelas enzimas da família do CYP450. O papel fundamental da isoforma CYP3A4 neste processo também foi identificado. Para aprofundar o entendimento sobre a contribuição dessas enzimas no processo de eliminação de compostos teste do organismo, o passo seguinte foi a identificação das isoformas diretamente envolvidas, por meio do uso de enzimas recombinantes. Valores de *clearance* intrínseco puderam ser determinados pela medida da concentração de composto remanescente ao longo do tempo. Além disso, a porcentagem da contribuição de cada CYP para o metabolismo total foi determinada com base na abundância relativa de cada isoforma em humanos. Os resultados obtidos são exibidos na **Tabela 19**.

A informação gerada foi essencial para a avaliação de possíveis interações do tipo fármaco-fármaco para essa série de compostos. Compostos que exibem múltiplas vias de eliminação tem um potencial de DDI reduzido, sendo selecionados preferencialmente para estágios mais avançados de pesquisa básica. Para a série de derivados benzimidazólicos, identificou-se metabolismo principal pela isoforma CYP3A4 (23 a 90 %), com contribuições mais modestas das isoformas CYP2D6 e CYP1A2. Isso caracteriza um perfil de metabolismo interessante, considerando-se DDI, apesar dos valores elevados de *clearance*.

Tabela 19 - Valores de CL_{int,u} (L/h/kg) e fração metabolizada (%) para diferentes isoformas do CYP450, utilizando-se enzimas recombinantes.

Composto	Estrutura	CYP3A4	CYP2D6	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	Fração %
1		9,67 L/h/Kg 58,51 %	1,78 L/h/Kg 10,77 %	4,30 L/h/Kg 26,02 %	0,36 L/h/Kg 2,15 %	0,42 L/h/Kg 2,56 %	
9		14,40 L/h/Kg 48,25 %	9,69 L/h/Kg 32,47 %	3,94 L/h/Kg 13,20 %	1,01 L/h/Kg 3,38 %	0,76 L/h/Kg 2,54 %	
21		53,00 L/h/Kg 88,42 %	2,76 L/h/Kg 4,60 %	0,30 L/h/Kg 0,50 %	1,24 L/h/Kg 2,07 %	2,62 L/h/Kg 4,37 %	
39		6,47 L/h/Kg 23,75 %	0,44 L/h/Kg 1,60 %	16,40 L/h/Kg 60,21 %	1,38 L/h/Kg 5,07 %	2,53 L/h/Kg 9,29 %	
7		5,71 L/h/Kg 75,85 %	1,40 L/h/Kg 18,60 %	<0,04 L/h/Kg 0,00 %	< 0,11 L/h/Kg 0,00 %	0,42 L/h/Kg 5,55 %	
15		24,50 L/h/Kg 68,72 %	4,18 L/h/Kg 11,72 %	2,29 L/h/Kg 6,42 %	4,04 L/h/Kg 11,33 %	0,61 L/h/Kg 1,70 %	
41		53,30 L/h/Kg 84,20 %	5,67 L/h/Kg 8,96 %	0,39 L/h/Kg 0,62 %	0,95 L/h/Kg 1,51 %	2,93 L/h/Kg 4,63 %	
8		22,5 L/h/Kg 62,45 %	7,10 L/h/Kg 19,71 %	2,11 L/h/Kg 5,86 %	1,78 L/h/Kg 4,94 %	2,54 L/h/Kg 7,05 %	
14		16,6 L/h/Kg 90,80 %	0,56 L/h/Kg 3,04 %	0,13 L/h/Kg 0,72 %	< 0,11 L/h/Kg 0,00 %	1,00 L/h/Kg 5,44 %	
16		21,60 L/h/Kg 70,87 %	5,06 L/h/Kg 16,60 %	3,54 L/h/Kg 11,61 %	< 0,11 L/h/Kg 0,00 %	1,00 L/h/Kg 5,44 %	

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.6 Identificação dos sítios de metabolismo dos compostos como subsídio para otimização da estabilidade metabólica

Biotransformação consiste na alteração química de um agente que ocorre em virtude de seu contato com um sistema biológico (*in vivo* ou *in vitro*) e refere-se especialmente a fármacos e outros xenobióticos. Essa alteração na molécula é frequentemente associada com a alteração (aumento, diminuição, ou pequena modificação) de sua atividade farmacológica. As reações principais são realizadas por enzimas da família CYP450.¹¹⁵

O objetivo deste experimento foi a detecção dos metabólitos formados a partir dos compostos teste, após a incubação por uma hora com microsomos de fígado. Os experimentos realizados para a determinação do perfil farmacocinético indicaram que os derivados benzimidazóis são instáveis metabolicamente. Nenhum dos compostos encontra-se no espaço fármaco-similar (**Figura 24**) e os valores elevados de *clearance* são devidos, principalmente,

ao metabolismo mediado pelas enzimas da Fase I do metabolismo de xenobióticos (CYP450, predominantemente, pela isoforma CYP3A4). Torna-se evidente a necessidade da otimização da estabilidade metabólica. Uma forma de atingir esse objetivo é a identificação dos sítios de metabolismo (SOM, do inglês, *sites of metabolism*), ou seja, as regiões suscetíveis as reações catalisadas pelas enzimas metabólicas.

Uma vez identificados os pontos sensíveis (do inglês, *soft spots*), pode-se adicionar grupos bloqueadores, os quais possam evitar ou dificultar a ligação às enzimas metabólicas, devido a modificação de características importantes, como volume ou propriedades físico-químicas. É importante destacar que estas modificações não podem afetar a magnitude da atividade do composto.

Quatro compostos foram escolhidos para a realização dos experimentos de biotransformação. Por sabermos que o metabolismo dos derivados benzimidazólicos ocorre pela ação das CYPs, os experimentos foram realizados por meio da identificação dos metabólitos formados após a incubação dos compostos teste com microsomos de fígado humano e de camundongo. Os resultados são ilustrados nas **Figuras 26 a 29**. Como pode-se observar, a maioria dos metabólitos são produtos da oxidação dos compostos em diferentes regiões, principalmente no benzimidazol e no espaçador. Um esquema simples de SAR foi estabelecido, com a racionalização de estratégias para bloquear os sítios de metabolismo (**Figura 30**).

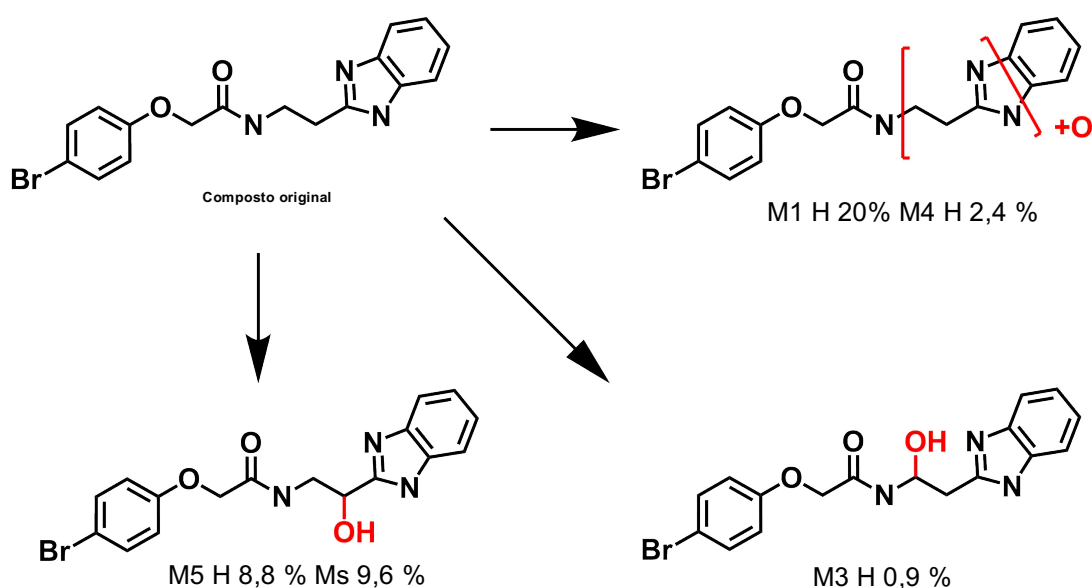


Figura 26 - Biotransformação do composto **3**. **M**: metabólito, **H**: humano, **Ms**: camundongo.
Fonte: Elaborada pela autora.

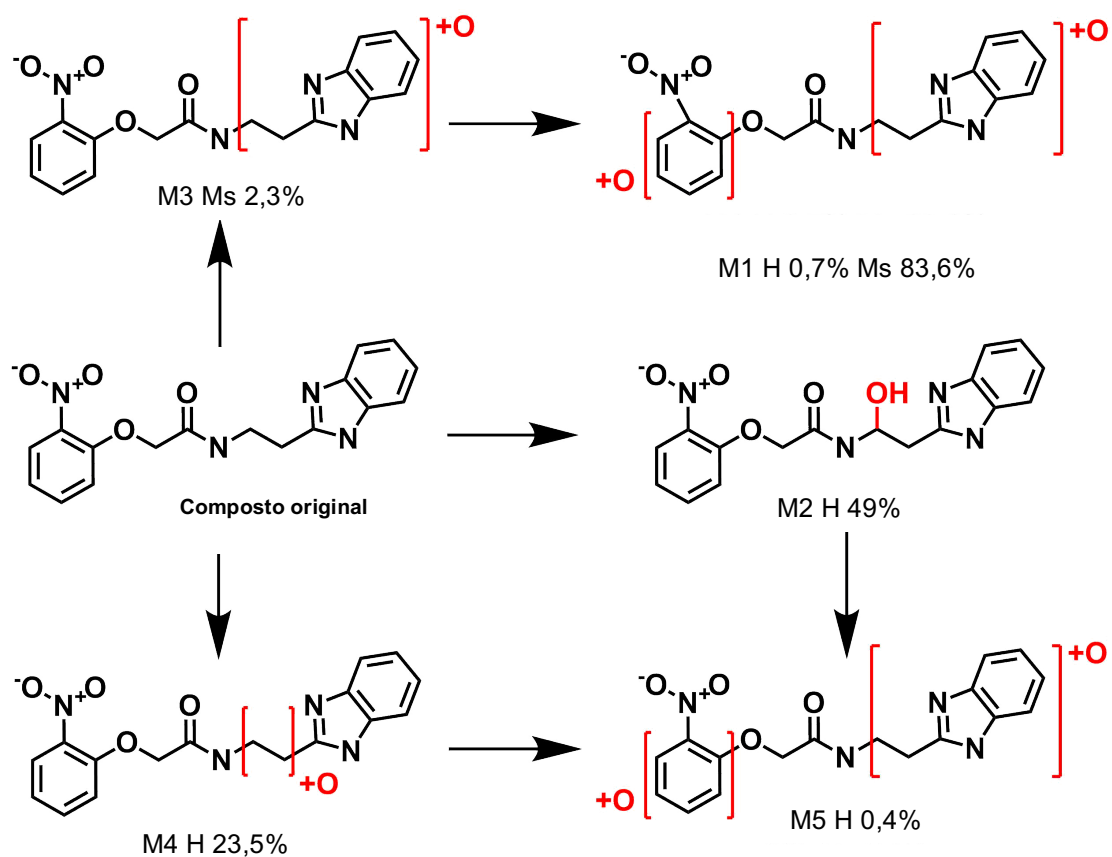


Figura 27 - Biotransformação do composto 14. **M**: metabólito, **H**: humano, **Ms**: camundongo.
 Fonte: Elaborada pela autora.

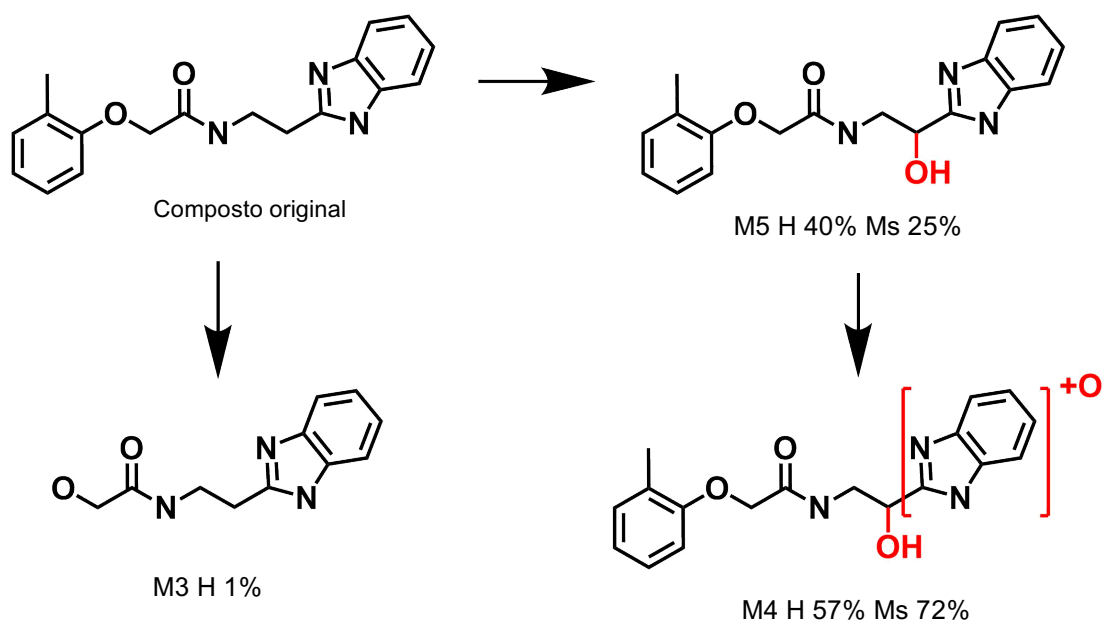


Figura 28 - Biotransformação do composto 9. **M**: metabólito, **H**: humano, **Ms**: camundongo.

Fonte: Elaborada pela autora.

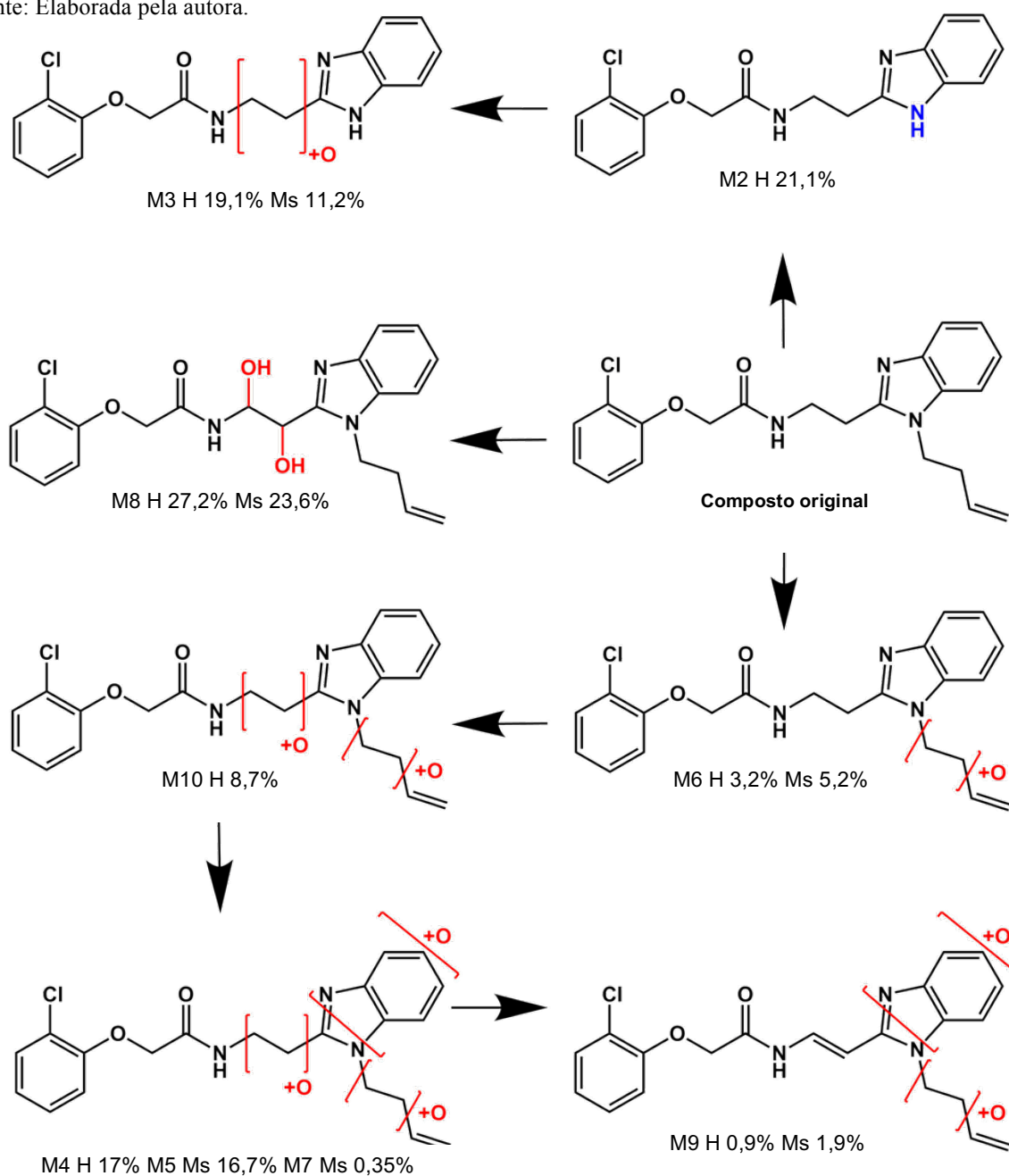


Figura 29 - Biotransformação do composto **41**. **M**: metabólito, **H**: humano, **Ms**: camundongo.
Fonte: Elaborada pela autora.

Com base nesses resultados, novos compostos foram planejados para aumentar a estabilidade metabólica. Estratégias estabelecidas empiricamente foram consideradas, como o bloqueio dos SOM por meio de átomos de halogênio. A otimização de características físico-químicas também foi proposta. Os novos compostos planejados, atualmente em fase de síntese no laboratório do Prof. Luiz Carlos Dias da UNICAMP, são ilustradas na **Figura 31**.

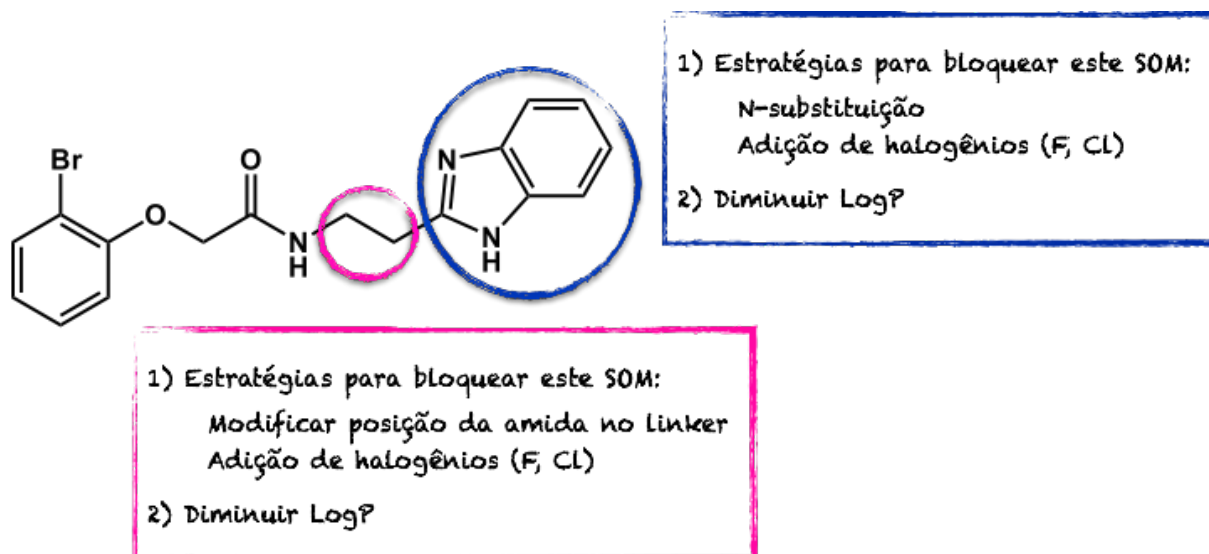


Figura 30 - Resumo dos resultados obtidos do experimento de biotransformação. Estratégias para bloquear os sítios de metabolismo (SOM).

Fonte: Elaborada pela autora.

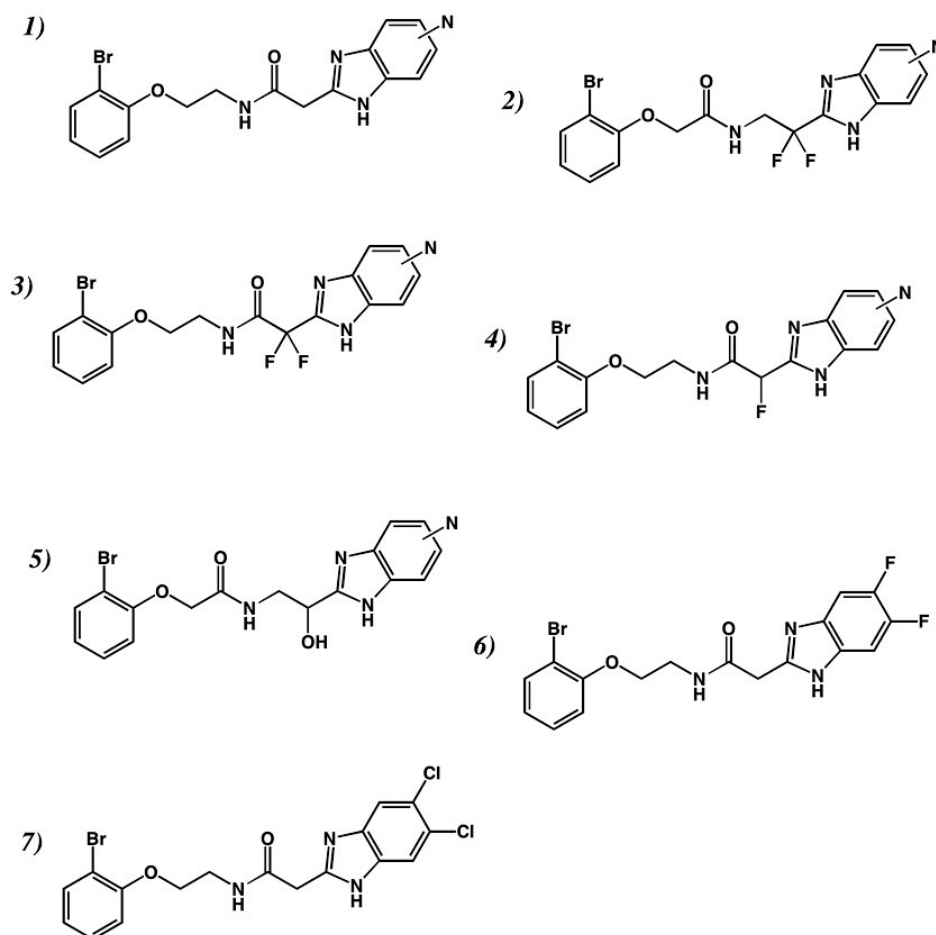


Figura 31 - Compostos planejados para aumentar a estabilidade metabólica.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.7 Baixa permeabilidade e ligação dos compostos a proteínas - interpretação da aparente falta de conexão entre valores de IC_{50} contra a cruzaina e o *T. cruzi*

Uma comparação dos valores de IC_{50} para a cruzaina e o *T. cruzi*, para os dez compostos cujo perfil farmacocinético foi avaliado nesse trabalho (**Tabela 17**), evidencia uma falta de correlação (**Figura 32A**, $R^2 = 0,04$). Uma explicação plausível poderia estar relacionada a ligação dos compostos teste às proteínas, uma vez que os ensaios celulares contra o *T. cruzi* foram conduzidos na presença de 10 % de soro fetal bovino (SFB), que está ausente nos ensaios de inibição contra a cruzaina. A ligação do composto teste às proteínas do SFB poderia estar reduzindo sua disponibilidade no ensaio. Por isso, a fração livre de cada composto em meio de cultura contendo 10 % de SFB foi determinada experimentalmente para que os valores de IC_{50} determinados contra o parasita pudessem ser corrigidos para incorporar esta variável. Os resultados são apresentados na **Tabela 20**.

Considerando-se que o composto teste tem que atravessar membranas biológicas para atingir o alvo terapêutico nos ensaios celulares com o *T. cruzi*, a baixa permeabilidade dos compostos teste (avaliada por meio dos experimentos de PAMPA), introduz uma barreira adicional que pode influenciar negativamente os resultados de potência.

Tabela 20 - Fração livre de composto (f_u) na presença de 10 % de SFB e permeabilidade dos compostos avaliada pelo ensaio de PAMPA.

Composto	Fração livre (f_u) 10 % SFB	P_{eff} PAMPA
1	0,19	5,60
6	0,55	2,20
7	0,15	4,90
8	0,27	5,90
13	0,34	0,70
14	0,04	0,30
15	0,14	0,70
20	0,19	4,70
38	0,09	19,70
40	0,08	7,70

Fonte: Elaborada pela autora.

A **Figura 32** mostra que a permeabilidade e a ligação às proteínas preenchem a lacuna observada quando comparados os resultados obtidos nos ensaios bioquímicos e celulares. No

quadro **A**, verifica-se a inexistência de correlação entre os valores de IC_{50} contra a cruzaina e o *T. cruzi*, quando nenhuma correção é considerada. O quadro **B** mostra uma melhor correlação entre esses valores ($R^2 = 0,40$), quando apenas a correção para a fração de composto livre em meio contendo 10 % SFB é considerada. Quando excluimos da análise somente os compostos com permeabilidade muito baixa ($P_{\text{eff}} < 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s, de acordo com os resultados de PAMPA), a correlação é ainda melhor ($R^2 = 0,66$, quadro **C**). Quando ambas, fração livre e permeabilidade dos compostos, são consideradas simultaneamente, a correlação atinge um valor de $R^2 = 0,76$ (quadro **D**). A partir destes resultados, fica evidente que se deve considerar a ligação às proteínas e a permeabilidade, sendo que a permeabilidade exerce uma influência maior.

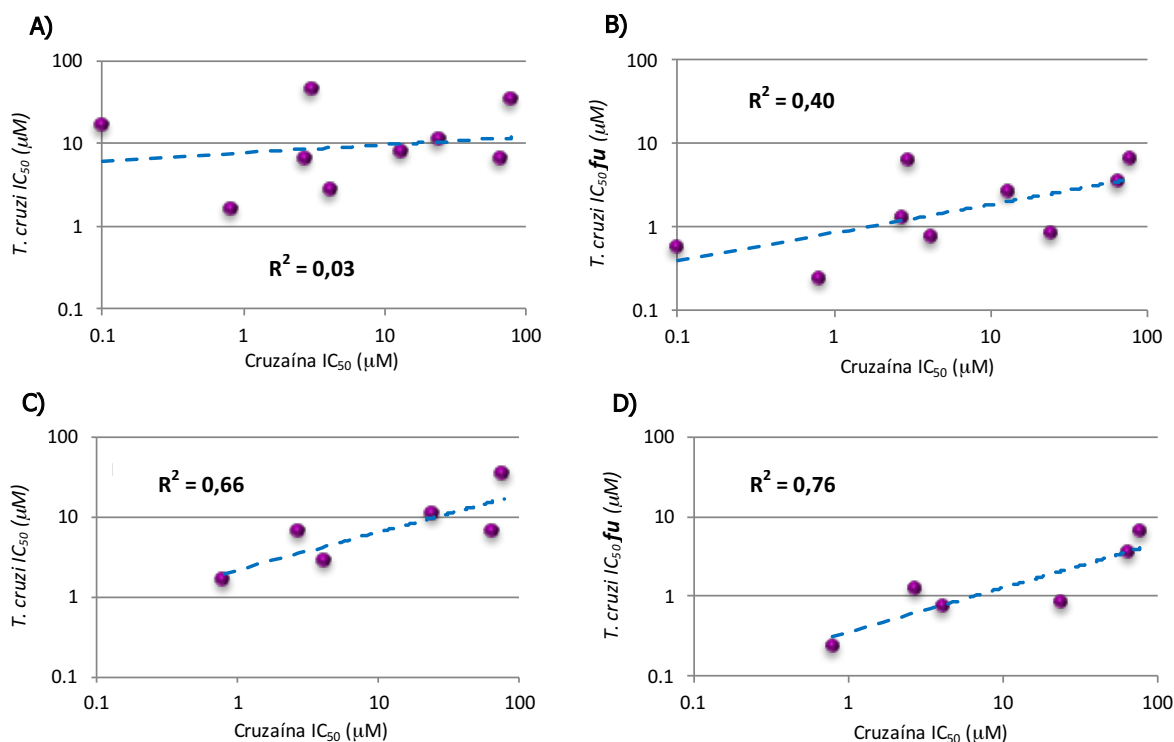


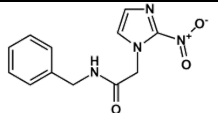
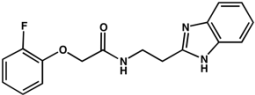
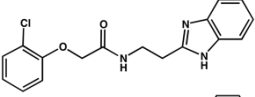
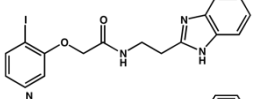
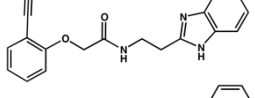
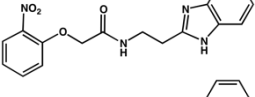
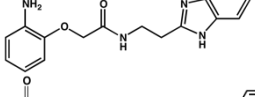
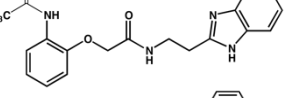
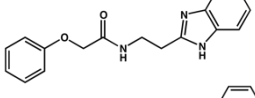
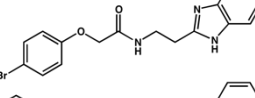
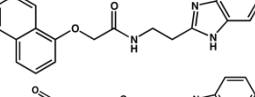
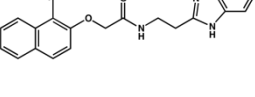
Figura 32 - Influência da permeabilidade e da ligação dos compostos às proteínas do meio de cultura contendo 10 % SFB, na correlação entre os valores de potência (IC_{50}) contra a cruzaina e o *T. cruzi*. **A**) Todos os compostos, sem correção alguma. **B**) Todos os compostos, com apenas a correção para a fração livre em meio de cultura contendo 10 % SFB. **C**) Compostos com baixa permeabilidade excluídos da correlação. **D**) Correção para a fração livre em 10 % SFB e exclusão dos compostos impermeáveis.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.8 Avaliação de um conjunto adicional de moléculas e estudos de SAR para a estabilidade metabólica dos derivados benzimidazólicos

Após a avaliação completa do perfil farmacocinético para o primeiro conjunto de dez compostos da série dos benzoimidazóis (**conjunto 1**), cujos resultados foram previamente descritos neste capítulo (itens **4.3.1** a **4.3.7**), um conjunto adicional de 55 moléculas (**conjunto 2**) foi avaliado. As moléculas que constituíram o **conjunto 2** foram selecionadas com base na quantidade de composto sintetizado disponível em miligramas. Os resultados para a caracterização do seu perfil farmacocinético, por meio da realização de ensaios de incubação *in vitro* dos compostos com microsossomos de fígado humano e de camundongo, foram sumarizados na **Tabela 21**.

Tabela 21 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.

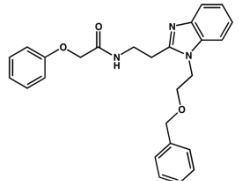
Composto	Estrutura	CLint (L/h/kg) Humano	CLint (L/h/kg) Camundongo	fu	CLint_u (L/h/kg) Humano	CLint_u (L/h/kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
BZ		1,50	4,43	1,00	1,50	4,43	0,84	3,17
3		7,03	125,00	0,94	7,45	132,56	2,90	1,61
4		19,50	ND	0,86	22,70	419,09	3,35	3,74
5		39,40	683,00	0,63	62,44	1.082,41	3,71	2,00
6		5,74	76,67	0,92	6,21	82,93	2,58	2,08
7		11,54	151,20	0,91	12,69	166,25	2,77	1,11
9		3,91	24,80	0,84	4,64	29,45	2,24	0,58
10		3,94	10,30	1,00	3,94	10,30	2,29	0,69
11		<1,50	72,10	1,00	1,50	72,10	2,90	4,21
13		9,99	199,32	0,62	16,19	323,05	3,79	3,96
16		23,80	504,00	0,34	70,62	1.495,55	4,02	2,35
17		37,30	669,00	0,52	71,18	1.276,72	3,65	0,62

(continua)

(continuação)

Tabela 21 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.

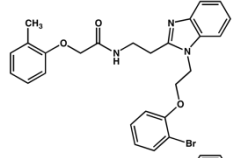
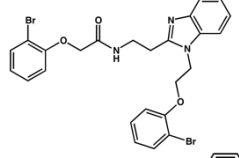
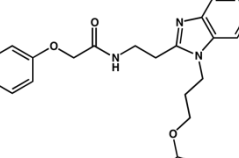
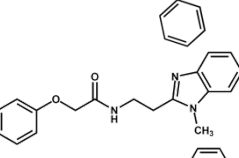
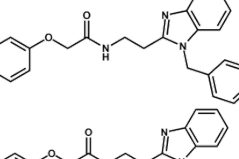
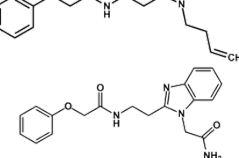
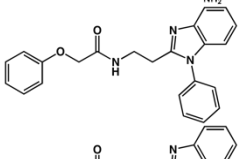
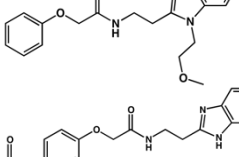
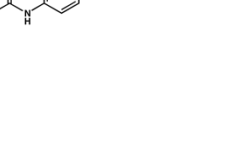

Composto	Estrutura	CLint (L/h/kg) Humano	CLint (L/h/kg) Camundongo	fu	CLint_u (L/h/kg) Humano	CLint_u (L/h/kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
18		24,70	757,00	0,77	32,04	981,84	3,42	0,29
19		ND	655,00	0,72	35,00	939,71	3,95	0,33
21		9,07	234,00	0,80	11,38	293,60	3,04	2,90
22		3,28	86,20	1,00	3,28	86,20	2,98	1,80
28		23,60	790,00	0,61	38,63	1.292,96	4,04	12,70
38		23,05	710,79	0,85	27,13	836,01	3,79	24,2
39		35,40	618,00	0,54	65,56	1.144,44	4,04	16,00
40		219,77	848,04	0,52	421,83	1.627,73	4,07	6,83
43		41,60	407,00	0,02	2.122,45	20.765,31	4,84	0,12
44		72,40	500,00	0,18	404,47	2.793,30	4,22	0,29
45		65,00	528,00	0,05	1.334,70	10.841,89	4,61	0,09
46		112,00	305,00	0,12	949,15	2.584,75	4,50	0,08
47		123,00	489,00	0,41	301,47	1.198,53	4,24	4,30

48		235,00	847,00	0,47	495,78	1.786,92	4,24	3,98
----	---	--------	--------	------	--------	----------	------	------

(continua)

(continuação)

Tabela 21 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se microsomos de fígado humano e camundongo.

Composto	Estrutura	CLint (L/h/kg) Humano	CLint (L/h/kg) Camundongo	fu	CLint_u (L/h/kg) Humano	CLint_u (L/h/kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
49		123,00	487,00	0,03	3.867,92	15.314,17	4,81	0,04
50		136,00	300,00	0,04	3.366,34	7.425,74	4,69	0,08
51		142,00	500,94	0,27	524,02	1.848,62	4,45	2,29
52		4,57	122,00	0,99	4,61	123,11	2,93	6,55
53		120,00	620,00	0,61	196,08	1.013,07	4,06	8,72
54		60,40	650,00	0,86	70,23	755,81	3,75	9,06
55		<1,50	5,34	0,98	1,53	5,43	2,16	0,71
56		58,10	713,00	0,63	92,37	1.133,55	4,04	17,8
57		23,00	235,00	1,00	23,00	235,00	3,13	9,35
58		<1,50	<4,43	1,00	1,50	4,43	1,92	0,21

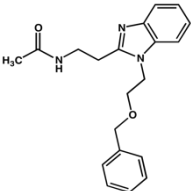
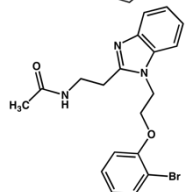
59		<1,50	20,80	0,99	1,51	20,88	1,59	0,17
60		3,54	217,00	1,00	3,54	217,00	1,80	0,20

(continua)

(continuação)

Tabela 21 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.

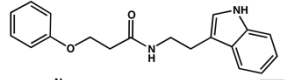
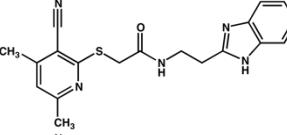
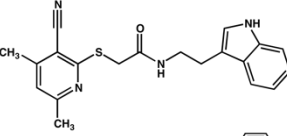
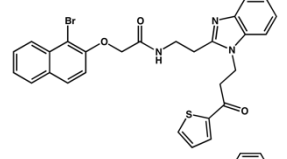
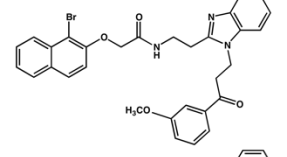
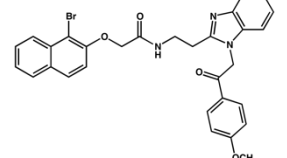
Composto	Estrutura	CLint (L/h/kg) Humano	CLint (L/h/kg) Camundongo	fu	CLint_u (L/h/kg) Humano	CLint_u (L/h/kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
61		<1,50	8,19	1,00	1,50	8,19	2,23	0,03
62		1,50	4,43	0,96	1,53	4,51	1,83	0,02
63		6,66	26,40	0,82	8,15	32,31	3,17	0,21
64		6,90	10,60	1,00	6,90	10,60	2,26	0,17
65		9,48	45,70	0,67	14,21	68,52	3,37	0,13
66		25,60	177,00	ND	232,73	1.609,09	3,89	0,34
68		6,58	67,50	1,00	6,58	67,50	2,98	2,17
69		11,00	22,70	0,99	11,07	22,84	1,88	0,38
72		<1,50	12,90	1,00	1,50	12,90	1,31	ND
73		1,78	35,90	0,91	1,94	39,06	3,09	5,46

74		4,75	95,10	0,97	4,90	98,14	3,09	6,65
75		9,38	306,00	0,94	9,97	325,19	3,52	3,60

(continua)

(conclusão)

Tabela 21 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.

Composto	Estrutura	CLint (L/h/kg) Humano	CLint (L/h/kg) Camundongo	fu	CLint_u (L/h/kg) Humano	CLint_u (L/h/kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
76		14,20	536,00	0,84	16,99	641,15	3,58	14,60
77		61,50	433,00	0,96	64,36	453,17	2,93	2,17
78		155,00	485,00	0,79	194,48	608,53	3,63	11,00
79		157,00	355,00	0,04	3.634,26	8.217,59	4,61	0,03
80		125,00	331,00	0,02	5.186,72	13.734,44	4,84	0,04
81		40,40	50,10	0,02	2.104,17	2.609,38	4,81	0,03

Fonte: Elaborada pela autora.

Compostos com valores de *clearance* mais baixos, em relação ao primeiro conjunto de derivados benzimidazólicos, foram identificados. Como pode ser observado na **Figura 33**, diversos compostos do segundo conjunto apresentaram valores equivalentes ao **BZ**, bem como uma melhor adequação na faixa de estabilidade metabólica considerada como fármaco-similar, ou seja, com valores de **CLint_u** menores que 10 L/h/kg.

Os valores de *clearance* da **Tabela 21** indicam que, apesar de não representar um sítio de metabolismo para a série de derivados benzimidazólicos, de acordo com os experimentos de biotransformação, a presença de substituintes na fenila pode influenciar substancialmente a estabilidade metabólica desses compostos. Substituintes nas posições *para* e *meta* da fenila, por exemplo, deram origem aos compostos mais estáveis, com os menores valores de *clearance* intrínseco (CL_{int}). Dentre os compostos com substituintes em *para*, destacamos o **58**, **59** e **62** com valores de *clearance* equivalentes ao **BZ** (CL_{int_u} em microsossomos humanos de 1,50 L/h/kg). Os compostos **60** (3,54 L/h/Kg), **61** (1,50 L/h/Kg) e **64** (6,90 L/h/Kg), com substituintes em *meta* na fenila, também se encontram na região fármaco-similar de estabilidade metabólica. Substituintes em *orto*, levam a compostos estáveis, porém, com valores de *clearance* mais elevados: **7** (6,21 L/h/kg), **7** (12,69 L/h/kg), **9** (4,64 L/h/kg), **10** (3,94 L/h/kg).

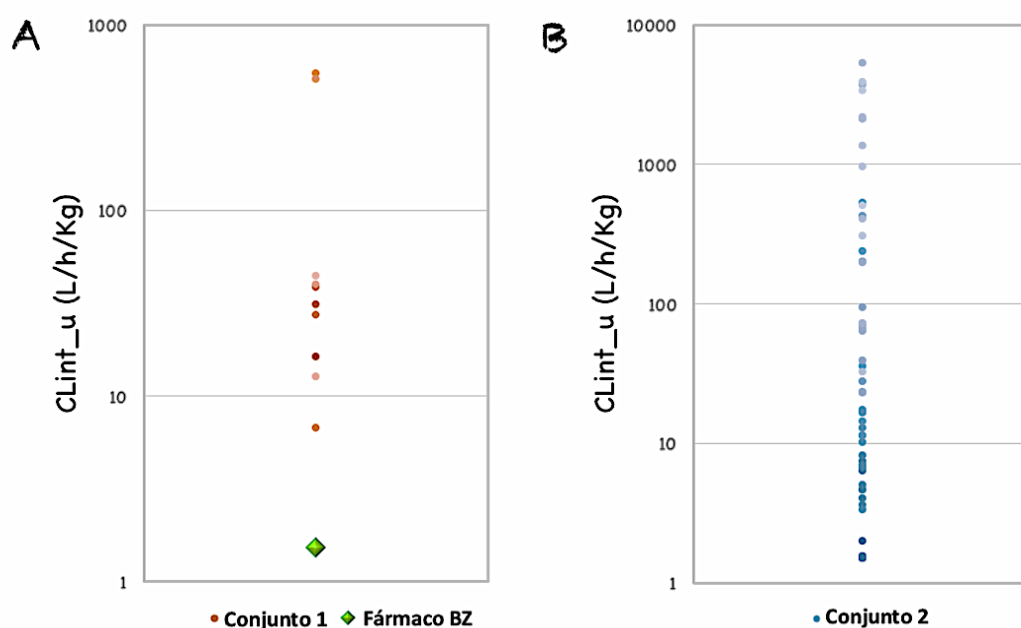


Figura 33 - Representação gráfica dos valores de *clearance* intrínsecos pela incubação dos compostos com microsossomos de fígado humano, considerando-se a correção para a fração de composto livre. Esta figura permite a comparação dos valores para os **conjuntos 1** e **2** de derivados benzimidazólicos, além de apresentar o BZ.

Fonte: Elaborada pela autora.

Essa série de compostos não apresenta grande variação no espaçador. Todavia, pode-se destacar o composto **21**, onde o átomo de oxigênio é substituído por um de enxofre (11,38 L/h/kg). Também os compostos **76** (16,99 L/h/kg) e **22** (3,28 L/h/kg), onde a posição da

amida é modificada pela introdução de uma metila, resultando em um aumento da estabilidade metabólica quando comparado ao primeiro conjunto de derivados.

A introdução de uma metila no benzimidazol deu origem a um composto com *clearance* de 4,61 L/h/kg, ao passo que a adição de um substituinte com características hidrofílicas levou a uma maior estabilidade metabólica (**55**, *clearance* de 2,16 L/h/kg). É interessante observar que os resultados, tanto para o espaçador quanto para o benzimidazol, estão de acordo com os estudos de SAR dos experimentos de biotransformação (subitem **4.2.6**, **Figura 30**), indicando que modificações nos SOM são capazes de influenciar positivamente a estabilidade metabólica dos compostos.

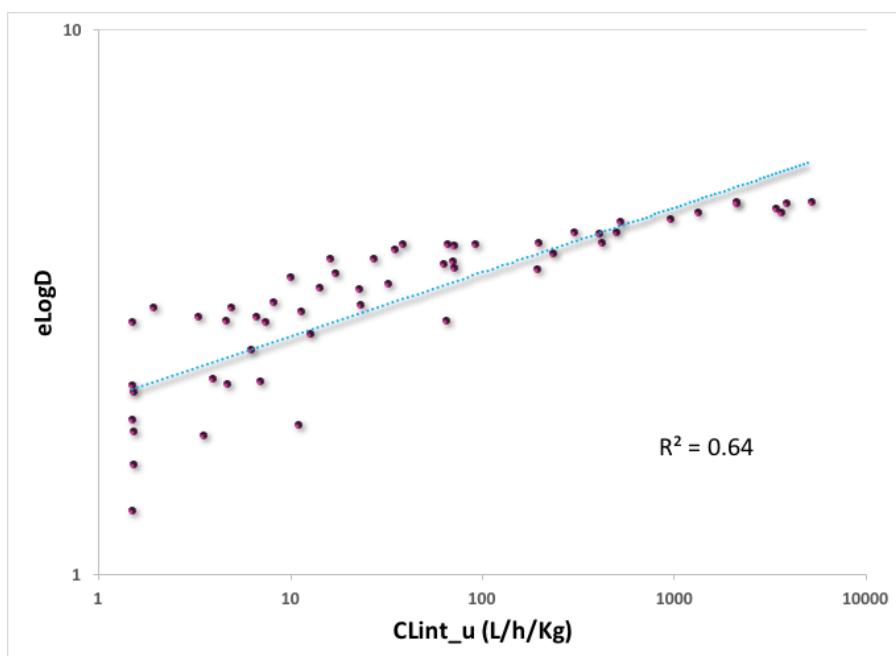


Figura 34 - Correlação entre os valores de *clearance* intrínseco (determinados pela incubação dos compostos com microsossomos de fígado humano, considerando-se a correção para a fração de composto livre) e a hidrofobia dos compostos (representada pela determinação experimental do eLogD).

Fonte: Elaborada pela autora.

É importante destacar a influência exercida pela natureza físico-química dos substituintes (na fenila e no benzimidazol) na estabilidade dos compostos. A introdução de substituintes hidrofóbicos, por exemplo, levou a um aumento dos valores de *clearance*. Os compostos **16** (70,62 L/h/kg), **39** (65,56 L/h/kg), **43** (2.122,45 L/h/kg) e **78** (194,48 L/h/kg) com substituintes hidrofóbicos na fenila, ilustram esta tendência. Substituintes hidrofóbicos no benzimidazol (**46**, **47**, **48**, **50**, **53**, **54** e **56**) seguem o mesmo padrão, apresentando valores

de *clearance* entre 70,23 e 3.366,34 L/h/kg. Da mesma forma, substituintes hidrofóbicos em ambos os sistemas aromáticos (**40**, **49**, **66**, **79**, **80** e **81**) apresentam valores de *clearance* intrínseco em microsomas de fígado humano entre 232,33 e 5.186,72 L/h/Kg.

De maneira geral, os valores de *clearance* para a série dos derivados benzimidazólicos tendem a aumentar a medida que aumenta a hidrofobia dos compostos (**Figura 34**). A introdução de substituintes polares é capaz de aumentar a estabilidade metabólica, como resultado de uma melhora geral das características físico-químicas. Além disso, é interessante observar que o composto **11**, que não possui substituinte em nenhum dos dois sistemas é bastante estável metabolicamente ($CL_{int} = 1,5$ L/h/kg). A **Figura 35** apresenta os estudos de SAR para o *clearance* metabólico dessa série de derivados.

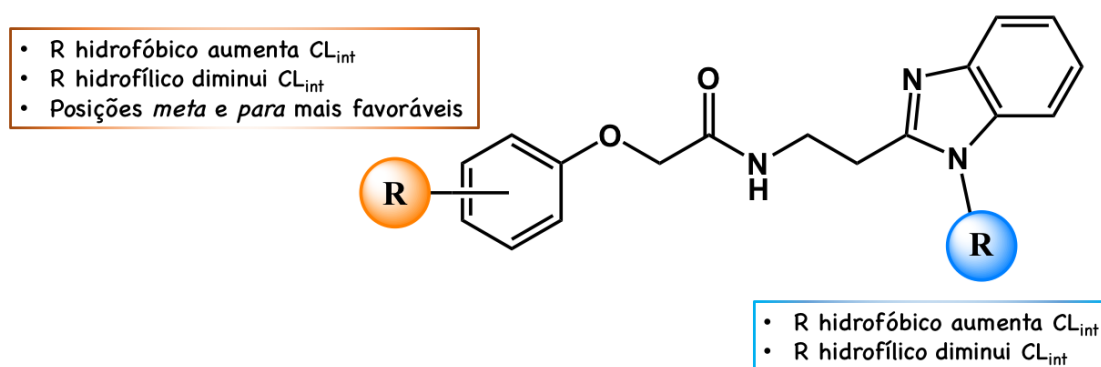


Figura 35 - Estudos de SAR dos parâmetros farmacocinéticos *in vitro*, CL_{int_u} observados pela incubação dos compostos com microsomas de fígado humano.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.9 MPO Score

MPO se refere a uma forma de mensurar a otimização de múltiplos parâmetros essenciais para a identificação de um potencial candidato a fármaco. Essa medida envolve a multiplicação do valor obtido para a potência de determinado composto (IC_{50} contra um alvo molecular, por exemplo) pela sua estabilidade metabólica (dada pelo valor de *clearance in vitro*).

A diminuição do valor de MPO indica que a otimização simultânea desses parâmetros afeta positivamente a qualidade do candidato a fármaco. Nesse trabalho de tese, a potência refere-se aos valores de IC_{50} dos compostos determinados contra a cruzaina. A estabilidade metabólica é dada pela medida do *clearance* intrínseco, obtido pela incubação dos compostos

com microsomas de fígado humano, considerando-se a correção para a fração de composto livre no ensaio (CLint_u). Os resultados para o cálculo da pontuação MPO podem ser visualizados na **Tabela 22**.

Os valores de pontuação MPO mostrados na **Tabela 22** estão representados graficamente na **Figura 36** para facilitar a visualização de sua distribuição e a comparação entre os **conjuntos 1 e 2**. Os valores de pontuação MPO foram utilizados para priorizar os compostos do segundo conjunto para os testes de PK *in vivo*.

Tabela 22 - Pontuação MPO e os parâmetros utilizados para o seu cálculo.

Composto	CLint _u (L/h/kg) Humano	IC ₅₀ cruzaina (µM)	MPO Score ^a
Conjunto 1			
1	16,0	0,8 ± 0,1	12,8
6	6,6	65,1 ± 1,2	429,7
7	39,2	13,2 ± 1,2	517,4
8	31,2	4,1 ± 1,1	127,9
13	12,5	2,7 ± 0,4	33,8
14	539,5	0,21 ± 0,04	113,3
15	43,9	3,0 ± 0,5	131,7
20	38,2	77,5 ± 1,4	2.960,5
40	501,1	23,9 ± 1,2	11.976,3
Conjunto 2			
3	7,4	5,0 ± 1,0	37,3
4	22,7	3,0 ± 1,0	68,1
5	62,4	1,6 ± 1,0	99,9
7	12,7	13,0 ± 1,0	164,9
11	1,5	10,9 ± 1,0	16,4
16	70,6	5,2 ± 1,0	367,2
17	71,2	13,5 ± 1,1	960,9
18	32,0	12,7 ± 1,2	407,6
19	35,0	8,3 ± 1,1	291,6
21	11,4	39,0 ± 1,0	443,8
40	421,8	24,0 ± 1,0	10.123,9
43	2.122,5	0,6 ± 0,2	1.252,2
44	404,5	0,5 ± 0,1	218,4
45	1.334,7	0,6 ± 0,2	814,2
47	301,5	0,4 ± 0,2	105,5
48	495,8	1,7 ± 0,4	837,9
51	524,0	1,8 ± 0,1	937,9
52	4,6	8,6 ± 1,7	39,6
53	196,1	1,1 ± 0,3	225,5
54	70,2	13,7 ± 1,4	960,8
55	1,5	12,1 ± 2,4	18,5
56	92,4	8,6 ± 2,6	789,8

57	23,0	8,8 ± 1,8	202,6
58	1,5	4,5 ± 0,6	6,8
62	1,5	9,0 ± 3,0	13,8
63	8,2	3,4 ± 0,9	27,9
64	6,9	28,0 ± 2,1	193,2
65	14,2	2,7 ± 0,7	37,8
66	232,7	2,3 ± 1,1	535,3
68	6,6	13,0 ± 1,7	85,5
69	11,1	18,0 ± 3,2	199,3

^a $MPO\ Score = IC_{50}^{cruzaína} \times CL_{int_u\ humano}$

Fonte: Elaborada pela autora.

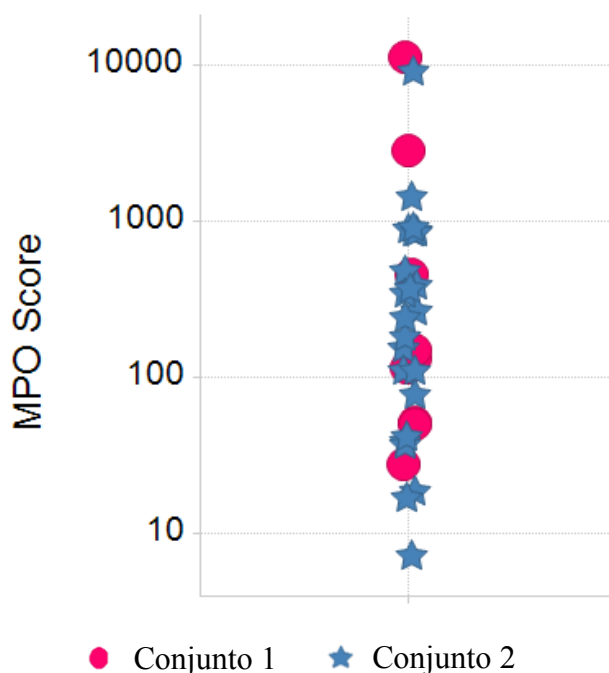


Figura 36 - Comparação entre as pontuações MPO para os compostos da série de derivados benzimidazólicos dos dois conjuntos avaliados nesse trabalho.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.10 Determinação *in vivo* dos parâmetros farmacocinéticos e correlação IVIVC

Sete compostos para os quais obteve-se os menores valores de MPO, foram avaliados em camundongos. Os resultados são mostrados na **Tabela 23**.

Os resultados da avaliação farmacocinética *in vivo* foram incorporados a análise IVIVC (**Figura 37**). A **Figura 37** mostra que a diminuição do *clearance* determinado *in vitro* se traduz na diminuição do *clearance* observado *in vivo*. Estes resultados corroboram e reforçam o uso de experimentos *in vitro* para a predição do *clearance in vivo* para essa série de derivados sintéticos. Além disso, indicam que o metabolismo dos compostos é realizado principalmente pelas enzimas da Fase I do metabolismo, uma vez que os microsomos não

contém as enzimas da Fase II. A ausência de correlação IVIVC poderia ser um indício da atuação de outras vias na eliminação dos compostos.

O espaço fármaco-similar de estabilidade metabólica foi alcançado pelos compostos **58** e **55**, que também estão entre os cinco melhores MPO *scores* (**Tabela 22**), fato que os tornam os candidatos a fármacos mais promissores identificados neste trabalho.

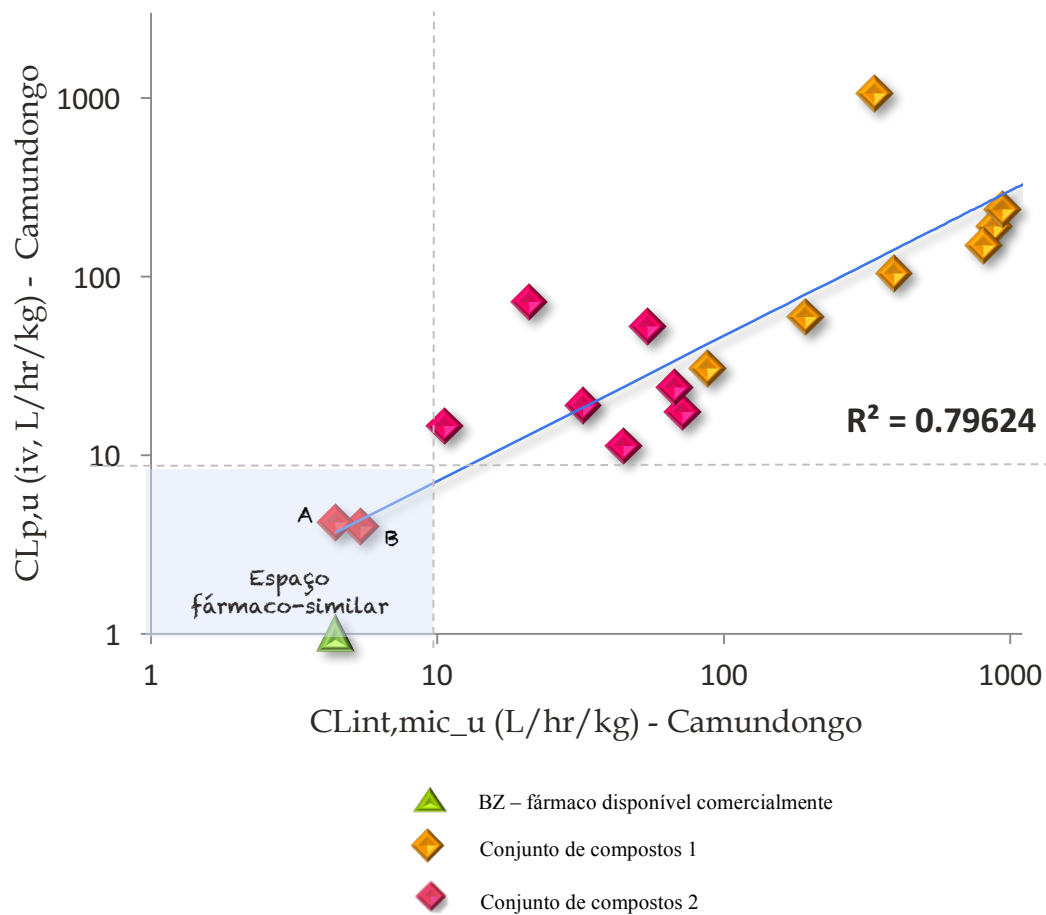
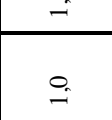

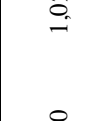



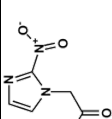
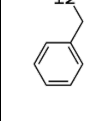


Figura 37 - Clearance IVIVC. Boa correlação, espaço fármaco-similar atingido pelos compostos **58** (A) e **55** (B).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 23. Estrutura e perfil farmacocinético *in vivo* para os compostos do segundo conjunto da série de derivados benzimidazólicos, utilizando-se camundongos.

Composto	Estrutura	Via intra-venosa					Via oral						
		$t_{1/2}$ (h)	C_0 (ng/mL)	V_{ss} (L/kg)	AUC (ng*h/mL)	CLP (L/h/kg)	fu	CLP _u (L/h/kg)	$t_{1/2}$ (h)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC (ng*h/mL)	F (%)
BZ		0,81	961	1,11	1.020	1,02	0,9	1,0	1,51	404	0,42	1.040	90
56		0,52	1.930	0,43	1.420	0,73	0,18	3,98	0,82	275	0,51	499	35
12		0,21	988	1,02	250	4,01	0,23	17,39	0,73	21	0,32	22,51	9
59		0,63	1.040	1,03	506	2,03	0,49	4,16	1,21	54	0,83	125,11	25
64		0,14	660	1,21	156	6,52	0,34	18,84	-	0	-	0	0
65		0,35	12.000	0,45	916	2,31	0,16	14,55	-	9	0,44	9,91	1
66		0,13	400	1,92	77	12,91	0,03	480,66	-	0	-	-	-
69		0,21	925	1,04	322	3,31	0,14	23,77	0,42	61	0,31	44,62	14

Fonte: elaborada pela autora.

4.3 Composto líder 2 – planejamento e avaliação de derivados de imidas cíclicas

O composto líder **2** (**Figura 38**) é um inibidor reversível e competitivo da enzima cruzaina. Essa molécula foi identificada por meio da combinação de metodologias de triagem virtual e HTS (do inglês, *High-Throughput Screening*).²⁴ Em contraste com o composto líder **1**, nenhum complexo cristalográfico foi determinado. Portanto, o seu modo de interação com a cruzaina foi predito por docagem molecular (**Figura 3**).

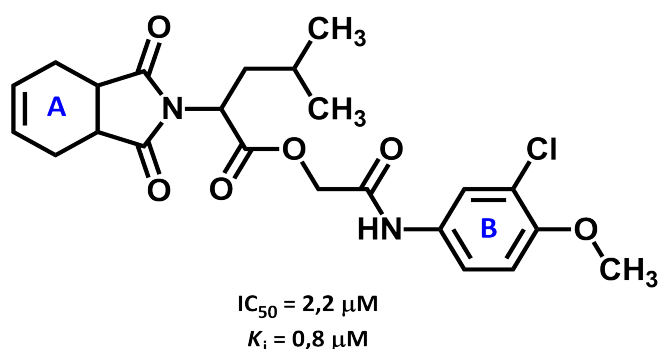


Figura 38 - Estrutura química do segundo composto líder (2).

Fonte: Elaborada pela autora.

Um conjunto de derivados de **2** foi planejado, sintetizado e avaliado contra a enzima alvo. Os resultados desses trabalhos são sumarizados na **Tabela 24**.

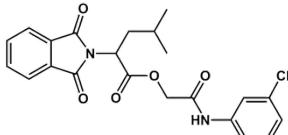
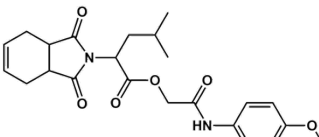
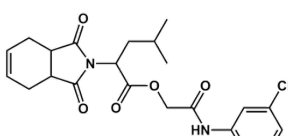
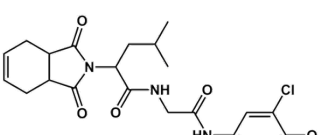
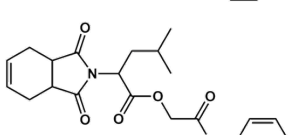
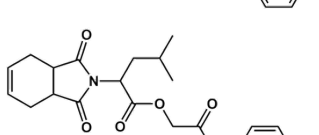
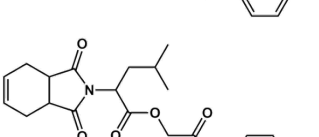
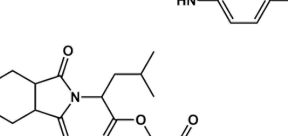
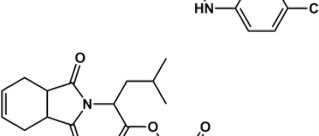
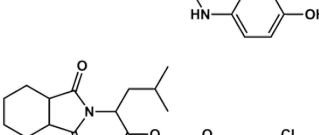
Tabela 24 - Estruturas e perfil de inibição de derivados do composto líder **2** contra a cruzaina.

Composto	Estrutura	% Inibição da cruzaina (100 μM) ^a	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
2		88	2,2 ± 0,4	0,8
82		40	ND	ND
83		42	ND	ND

(continua)

(continuação)

Tabela 24 - Estruturas e perfil de inibição de derivados do composto líder **2** contra a cruzaina.

Composto	Estrutura	% Inibição da cruzaina (100 μM) ^a	IC ₅₀ (μM)	K _i (μM)
84		27	ND	ND
85		87	13,9 ± 1,1	ND
86		68	40,1 ± 1,3	ND
87		38	ND	ND
88		77	16,7 ± 1,3	ND
89		74	20,5 ± 1,3	ND
90		54	ND	ND
91		56	ND	ND
92		6	ND	ND
93		75	4,2 ± 1,5	ND

(continua)

(conclusão)

Tabela 24 - Estruturas e perfil de inibição de derivados do composto líder **2** contra a cruzaina.

Composto	Estrutura	% Inibição da cruzaina (100 μ M) ^a	IC ₅₀ (μ M)	K _i (μ M)
94		96	2,3 \pm 1,1	0,7
95		96	1,4 \pm 0,7	0,2
96		0	ND	ND
97		35	ND	ND
98		88	12,1 \pm 1,2	ND
99		58	ND	ND
100		6	ND	ND
101		14	ND	ND
102		79	2,1 \pm 1,2	ND

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

Fonte: Elaborada pela autora.

Algumas observações podem ser feitas com base nos resultados dos estudos de cinética e modelagem molecular. Primeiramente, as modificações no sistema imídico cíclico tetrahydroftalimida revelaram que o derivado saturado em **A** (**93**) apresentou uma diminuição da potência ($IC_{50} = 4,2 \mu M$) em relação ao composto líder (**2**, $IC_{50} = 2,2 \mu M$). Quando em **A** está presente uma fenila (imida cíclica do tipo ftalimida), a porcentagem de inibição da cruzaina caiu de 88% (composto líder) para ~40% (**82** e **83**), e 27% (**84**), o que sugere que a presença do anel aromático seja desfavorável. Por outro lado, o derivado maleimídico **94** mostrou potência inibitória semelhante ($IC_{50} = 2,3 \mu M$) ao do composto **2**, indicando não ser essencial a presença do sistema **A** para a atividade. Além disso, o composto **98**, um derivado de **95**, cuja única diferença estrutural reside na saturação da dupla ligação, exibiu potência da ordem de 6 vezes menor ($IC_{50} = 12,1 \mu M$). Para os compostos em que o sistema imídico é substituído por outros sistemas, tais como piperazina (**97**), pirrolidina (**100**) ou morfolina (**101**), a atividade de inibição da cruzaina é completamente perdida.

A tolerância para a introdução ou remoção de substituintes na fenila (sistema **B**, **Figura 38**) também foi avaliada. Os resultados indicam que os substituintes presentes no composto líder (**2**), cloro e metoxila, são importantes, mas não essenciais, para a atividade de inibição da cruzaina. A remoção dos dois substituintes (**88**) levou à diminuição da potência em cerca de 8 vezes ($IC_{50} = 16,7 \mu M$) em relação ao líder ($IC_{50} = 2,2 \mu M$). Em uma comparação direta, a metoxila parece ter o papel mais importante, já que a sua presença (**85**) levou a uma diminuição da potência da ordem de 6 vezes ($IC_{50} = 13,9 \mu M$). Já o derivado contendo apenas o cloro (**86**) resultou em um valor de IC_{50} de $40,1 \mu M$.

A substituição da fenila (anel **B**) por uma naftila levou a um derivado equipotente (**102**) ($IC_{50} = 2,1 \mu M$). A presença de Br (**90**), Cl (**91**) ou de uma hidroxila (**92**) na posição *para* em **B**, deu origem a compostos inativos. A presença de F (**89**), na mesma posição, gerou um composto 10 vezes menos potente ($IC_{50} = 20,5 \mu M$), quando comparado ao líder (**2**).

A substituição da isopropila por uma benzila (**95**) levou ao composto mais potente desta série. Os estudos de modelagem molecular do complexo entre a cruzaina e esse inibidor (**Figura 39**) revelaram que esta porção da molécula ocupa um bolsão hidrofóbico do sítio ativo da cruzaina, onde se encontram os resíduos Trp184 e His162, proporcionando maior complementaridade proteína-ligante. A importância da presença de um grupo hidrofóbico nesta posição foi corroborada pela ausência de atividade do composto **96**, no qual o grupo isopropila do composto líder está ausente. No entanto, a substituição da isopropila por um

A importância do éster, na porção que une os dois sistemas de anéis, é demonstrada pela análise do composto **87**, que apresenta uma função amida. Nesse caso, a modificação molecular levou a um derivado inativo. Os estudos de SAR para esta série de derivados imídicos são sintetizados na **Figura 40**.

Assim como o composto líder (**2**), os derivados investigados mantêm o mecanismo de inibição do tipo competitivo, como determinado por meio de estudos de cinética enzimática. Os gráficos de *Lineweaver-Burk* para os compostos mais potentes desta série **94**, **95** e **102** são apresentados na **Figura 41**.

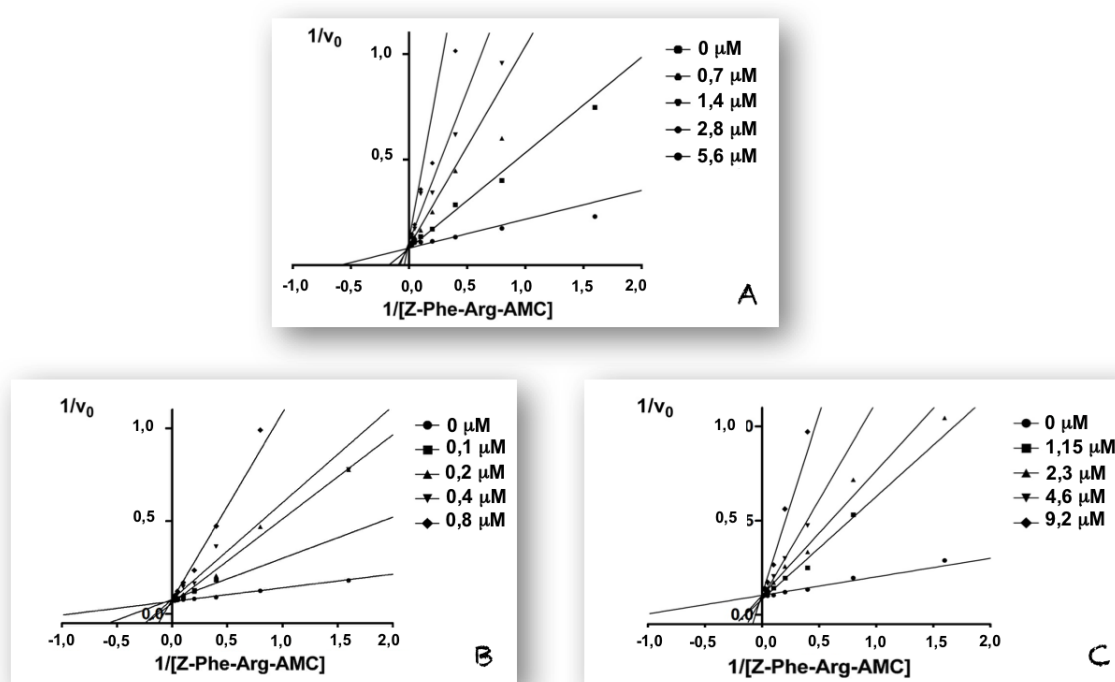


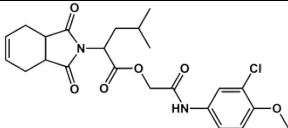
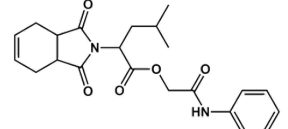
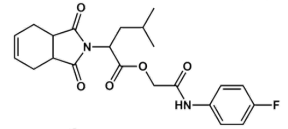
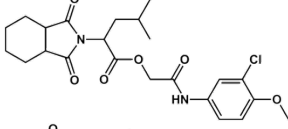
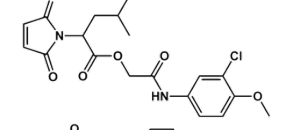
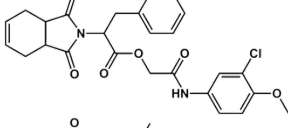
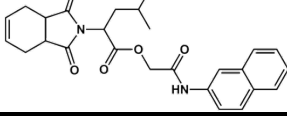
Figura 41 - Gráficos de duplo-recíproco de *Lineweaver-Burk* para os compostos **94** (A), **95** (B) e **102** (C).
Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.1 Avaliação da atividade antiparasitária dos derivados imídicos

Os compostos mais promissores dessa série foram submetidos a avaliação em culturas celulares infectadas pelo *T. cruzi*. Os valores de IC_{50} são apresentados na **Tabela 25**.

Os resultados mostram que apenas os compostos **94** e **102** apresentaram atividade antiparasitária. Destaca-se o composto **94**, potente inibidor da cruzaina ($IC_{50} = 2,3 \pm 1,1$), cujo valor de IC_{50} contra o *T. cruzi* ($0,9 \pm 0,3$) é o mais relevante dentre todos os compostos avaliados nessa tese.

Tabela 25 - Atividade *in vitro* de derivados imídicos contra o *T. cruzi*.

Composto	Estrutura	IC ₅₀ (μM) ^a	PAMPA	eLogD	LogP	PSA
2		> 100	ND	ND	ND	ND
88		> 100	16,8	4,1	2,5	92,8
89		> 100	11,0	4,2	2,7	92,8
93		> 100	2,2	4,5	3,6	102,1
94		0,9 ± 0,3	4,9	4,0	2,5	102,1
95		> 100	2,7	4,4	3,5	102,1
102		32,9 ± 4,9	0,6	4,7	3,4	92,8

^aOs valores de IC₅₀ dos compostos contra o *T. cruzi*, cepa Tulahuen representam médias de pelo menos 3 experimentos individuais. BZ = benzimidazol. Valores de eLogD e PAMPA foram determinados experimentalmente. LogP e PSA foram preditos computacionalmente. Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Determinação *in vitro* de parâmetros farmacocinéticos para os derivados imídicos com microssomos de fígado

Os compostos mais promissores dessa série contra o *T. cruzi* foram submetidos a ensaios para determinação do perfil farmacocinético e da estabilidade metabólica. Esses estudos foram realizados na empresa farmacêutica norte-americana AbbVie, durante o estágio de doutorado-sanduíche BEPE/FAPESP. Os resultados estão descritos na **Tabela 26**.

De maneira geral, os compostos desta série apresentaram valores de *clearance* bastante elevados (47 a 160 L/h/kg), indicando uma instabilidade metabólica. As exceções são os compostos **97** (CL_{int_u} = 1,5 L/h/kg) e **101** (CL_{int_u} = 13,0 L/h/kg), em que o sistema imídico foi trocado por piperidina e morfolina, respectivamente. Entretanto, esses compostos

não apresentam atividade contra a enzima alvo, especialmente pela ausência do sistema imídico que foi identificado como essencial para inibição da cruzafina.

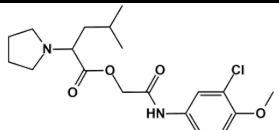
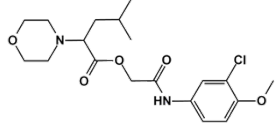
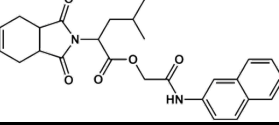
Tabela 26 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* para a série de derivados imídicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.

Composto	Estrutura	CLint (L/h/Kg) Humano	CLint (L/h/Kg) Camundongo	fu	CLint_u (L/h/Kg) Humano	CLint_u (L/h/Kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
BZ		1,50	4,43	1,00	1,50	4,43	0,84	3,17
2		80,21	127,00	0,71	110,56	178,87	4,38	2,65
85		159,98	372,00	0,27	590,40	1.372,78	4,01	4,90
88		158,00	ND	0,27	583,06	ND	4,06	16,80
89		113,93	225,41	0,27	420,43	831,81	4,20	11,12
93		153,00	352,00	0,27	564,61	1.298,97	4,48	2,23
94		159,98	372,00	0,27	590,40	1.372,78	4,01	4,90
95		120,21	189,33	0,63	190,40	301,00	4,42	2,69
97		1,50	57,70	0,44	3,42	131,44	3,73	0,03
98		47,00	470,00	0,27	173,44	1734,42	3,68	13,5
99		93,30	135,00	0,27	344,30	498,19	4,91	0,16

(continua)

(continuação)

Tabela 27 - Estrutura e perfil farmacocinético *in vitro* para a série de derivados imídicos, utilizando-se microsossomos de fígado humano e camundongo.

Composto	Estrutura	CLint (L/h/Kg) Humano	CLint (L/h/Kg) Camundongo	fu	CLint_u (L/h/Kg) Humano	CLint_u (L/h/Kg) Camundongo	eLogD	PAMPA
100		62,00	753,00	0,30	206,67	2.510,00	4,24	1,20
101		13,00	133,00	0,30	43,33	443,33	3,99	10,50
102		116,00	315,00	0,27	428,07	1.162,43	4,74	0,61

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.3 Identificação dos sítios de metabolismo como subsídio para otimização da estabilidade metabólica dos compostos

Os derivados imídicos **94** e **102** foram escolhidos para a realização de ensaios de biotransformação e, conseqüentemente, para a identificação de seus sítios de metabolismo. Os compostos foram incubados com as frações S9 de fígado humano e de camundongo por 1 h. As análises mostraram que os compostos são bastante instáveis metabolicamente, não sendo ionizados adequadamente. Uma degradação significativa do composto parental foi observada inclusive na amostra inicial, referente ao tempo 0 h, bem como na solução estoque. Alguns dos produtos de degradação observados incluem a abertura do anel pirrolidinediona, *N*-desalquilação e *O*-desalquilação. Além disso, os compostos parecem apresentar alta reatividade química, uma vez que oxidação e conjugação-GSH dos compostos parentais foram observadas nas amostras nos tempos de 0 e 1 h.

5 CONCLUSÕES

Nesse trabalho de tese de doutorado, o planejamento de candidatos a novos antichagásicos teve como base dois compostos líderes, inibidores da enzima cruzaina. Esses compostos pertencem a duas classes químicas: um derivado benzimidazólico (**1**) com $K_i = 2,0 \mu\text{M}$ e um derivado imídico (**2**) $K_i = 0,8 \mu\text{M}$. Séries de derivados foram planejadas, sintetizadas e avaliadas em vários modelos experimentais. Várias modificações moleculares foram exploradas, levando a estudos de SAR e ao entendimento das características estruturais essenciais para a inibição enzimática. Entre os derivados benzimidazólicos, o inibidor mais potente (**15**) mostrou um aumento significativo da atividade inibitória da cruzaina ($\text{IC}_{50} = 200 \text{ nM}$, $K_i = 82 \text{ nM}$) em relação ao composto líder ($\text{IC}_{50} = 800 \text{ nM}$, $K_i = 2000 \text{ nM}$). Além disso, apresentou considerável potência *in vitro* contra o *T. cruzi* ($\text{IC}_{50} = 16,2 \mu\text{M}$). Por outro lado, as modificações propostas para os derivados imídicos levaram ao composto **95**, que foi mais potente ($\text{IC}_{50} = 1,4 \mu\text{M}$, $K_i = 0,19 \mu\text{M}$) que o composto líder ($\text{IC}_{50} = 2,2 \mu\text{M}$, $K_i = 0,8 \mu\text{M}$). Também foi identificado o composto **94** ($\text{IC}_{50} = 2,3 \mu\text{M}$, $K_i = 0,7 \mu\text{M}$), equipotente ao composto líder contra a cruzaina. Entretanto, apresentou também atividade antiparasitária significativa ($\text{IC}_{50} = 0,9 \mu\text{M}$), em oposição aos compostos líder e **95**, que foram inativos em ensaios celulares contra o *T. cruzi*.

O mecanismo de inibição para os compostos mais promissores foi determinado. Os derivados imídicos apresentaram mecanismo do tipo competitivo, seguindo o modo de inibição do composto líder da série. Entre os derivados benzimidazólicos, o mecanismo de inibição competitivo foi observado para grande parte dos compostos investigados. Contudo, uma exceção importante foi observada para a série que apresenta o benzimidazol *N*-substituído. Apesar de potentes, esses derivados atuam por um mecanismo de inibição do tipo não-competitivo. Estudos preliminares de toxicidade em linhagens celulares (Vero e fibroblastos) e *in vivo* (camundongos), mostraram que os compostos estudados apresentam um perfil seguro, o que sugere a continuidade dos estudos.

A realização de um estágio de doutorado sanduíche no departamento de metabolismo de fármacos e farmacocinética da empresa farmacêutica norte-americana AbbVie possibilitou a determinação de parâmetros farmacocinéticos de uma série substancial de compostos. Ademais, foi empregada uma metodologia inovadora denominada MPO (do inglês, *Multi Parametric Optimization*), que tem como objetivo a otimização de múltiplos parâmetros de um composto teste. Esse método foi utilizado para a identificação de candidatos com um

perfil mais equilibrado entre potência e farmacocinética, propriedades essenciais para o desenvolvimento de um fármaco eficaz e seguro. Primeiramente, identificou-se que a série de derivados benzimidazólicos apresentava elevados valores de *clearance* (*in vitro* e *in vivo*), levando a uma baixa biodisponibilidade. Para melhorar os parâmetros farmacocinéticos para essa série, uma correlação *in vitro* x *in vivo* (IVIVC) foi estabelecida para o parâmetro de *clearance*. Identificou-se que as reações de oxidação catalisadas por enzimas do metabolismo de Fase I, principalmente pela CYP3A4, eram a via principal de metabolismo dessas moléculas. Experimentos de biotransformação foram conduzidos, os sítios de metabolismo identificados e estudos de SAR foram estabelecidos, fornecendo subsídios importantes para bloqueá-los. Um segundo conjunto de derivados benzimidazólicos foi planejado e avaliado, apresentando maior estabilidade metabólica, bem como um melhor equilíbrio de propriedades (potência e farmacocinética). A utilização da estratégia MPO levou a identificação de dois compostos (**55** e **58**) capazes de ocupar um espaço fármaco-similar privilegiado, quando se trata de estabilidade metabólica. Além disso, foi possível concluir que a baixa permeabilidade dos compostos e a ligação as proteínas (contidas nos 10% de SFB utilizado nos ensaios celulares contra o *T. cruzi*), influenciam os resultados de potência contra o parasita, causando desconexão quando resultados bioquímicos e celulares são comparados.

Os estudos apresentados nessa tese de doutorado contribuem sobremaneira para a inovação na pesquisa em fármacos no Brasil. As metodologias empregadas no planejamento de ligantes bioativos e a sua integração para otimização concomitante de parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos representam o estado-da-arte nessa área de pesquisa. Os estudos de farmacocinética ainda representam um grande gargalo para o avanço das pesquisas no Brasil. Acredita-se que a sua incorporação em um estágio inicial da pesquisa básica seja o caminho a ser seguido, já que esses estudos são essenciais para o desenvolvimento de candidatos a novos fármacos eficazes e seguros, porém. Nesse trabalho, esses estudos foram possíveis graças a parceria de nosso laboratório com a DNDi e a AbbVie, destacando-se uma vez mais a importância de parcerias internacionais de alta qualidade, envolvendo a interação com empresas farmacêuticas.

6 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse trabalho proporcionaram a criação de uma nova estratégia para a triagem de candidatos a fármacos para a doença de Chagas (**Figura 42**). Em vez de considerar somente a otimização da potência contra o alvo molecular e o parasita, a nova proposta incorpora a determinação e a otimização simultâneas de parâmetros farmacocinéticos.



Figura 42 - Esquema de triagem para novos candidatos a antichagásicos, considerando a otimização de múltiplos parâmetros (MPO).

Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente, três experimentos devem ser conduzidos concomitantemente: i) a determinação da potência do composto teste contra o alvo, neste caso específico, a enzima cruzaina; ii) a determinação da sua estabilidade metabólica pela incubação com microsossomos de fígado (considerando a fração de composto livre como fator de correção); e iii) a avaliação da permeabilidade pelo método PAMPA, uma vez que ele se mostrou essencial para a determinação e a correlação entre valores de potência contra a cruzaina e o *T. cruzi*.

O segundo passo consiste em determinar a potência dos compostos contra o parasita. Estes quatro ensaios são realizados de forma iterativa, retroalimentando o conjunto de informações necessárias para o planejamento, síntese e priorização de compostos, até que uma

combinação ideal entre potência (nanomolar) e propriedades farmacocinéticas (clearance abaixo de 10 L/h/kg) seja alcançada.

Em seguida, recomenda-se a determinação do índice de seletividade, onde o composto teste é avaliado em células saudáveis não infectadas com o parasita. Esta também é uma forma preliminar de avaliar a sua toxicidade. Estudos para a determinação dos parâmetros farmacocinéticos *in vivo* podem ser realizados para os compostos seletivos e não tóxicos.

A correlação *in vitro* – *in vivo* (IVIVC) deve ser determinada. Se for provada que existe, esta etapa não precisará ser realizada para os demais compostos da mesma série química. Compostos estáveis metabolicamente *in vivo* devem ter sua eficácia avaliada em modelos *in vivo* da doença de Chagas. Por fim, os compostos capazes de diminuir a parasitemia em concentrações baixas podem ser propostos como novos candidatos a antichagásicos.

REFERÊNCIAS

- 1 TIBAYRENC, M.; TELLERIA, J. **American trypanosomiasis chagas disease: one hundred years of research.** 2nd ed. Burlington: Elsevier, 2010.
- 2 CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- 3 PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S10-1, 2010.
- 4 BERN, C. et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655-81, 2011.
- 5 AUFDERHEIDE, A. C. et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, 2004.
- 6 COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. a systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, 2010.
- 7 COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-7, 2010.
- 8 DUMONTEIL, E. et al. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. **Expert Review of Vaccines**, v. 11, n. 9, p. 1043-55, 2012.
- 9 RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-402, 2010.
- 10 KLOTZ, S. A. et al. Free-roaming kissing bugs, vectors of Chagas disease, feed often on humans in the Southwest. **American Journal of Medicine**, v. 127, n. 5, p. 421-6, 2014.
- 11 REISENMAN, C. E. et al. Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 16, n. 3, p. 400-5, 2010.
- 12 PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION'S. **Health in the Americas 2007.** Washington: PAHO, 2007. (PAHO scientific and technical publication, 622).
- 13 MARIN-NETO, J. A. et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109-23, 2007.
- 14 HOTEZ, P. J. et al. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. e1498, 2012.
- 15 CHAGAS disease: control and elimination. Geneva, 2010. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_63.20_Eng.pdf>. Acesso em: 21 de maio de 2015.

16 NUNES, M. C. et al. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, n. 9, p. 767-76, 2013.

17 RIBEIRO, A. L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 10, p. 576-89, 2012.

18 FRANCO-PAREDES, C. et al. Chagas disease: an impediment in achieving the Millennium Development Goals in Latin America. **BMC International Health and Human Rights**, v. 7, p. 7, 2007.

19 LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **Lancet Infectious Disease**, v. 13, n. 4, p. 342-8, 2013.

20 CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S12-5, 2010.

21 CASTRO, J. A.; DE MECCA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, n. 8, p. 471-9, 2006.

22 RODRIQUES COURA, J.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

23 SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.

24 RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

25 TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785-99, 2006.

26 SCHECHTER, I. Reprint of "on the size of the active site in proteases. I. Papain". **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 3, p. 497-502, 2012.

27 DOYLE, P. S. et al. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3932-9, 2007.

28 CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 12, p. 1143-56, 2001.

29 ENGEL, J. C. et al. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 5, p. 597-606, 1998

30 BRAK, K. et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763-73, 2010.

- 31 BRINEN, L. S. et al. A target within the target: probing cruzain's P1' site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. **Structure**, v. 8, n. 8, p. 831-40, 2000.
- 32 CHEN, Y. T. et al. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, e825, 2010.
- 33 FERREIRA, R. S. et al. Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 13, p. 4891-905, 2010.
- 34 GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, v. 6, n. 8, p. 1603-11, 1997.
- 35 HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Crystal structures of reversible ketone-Based inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 21-9, 2003.
- 36 KERR, I. D. et al. Vinyl sulfones as antiparasitic agents and a structural basis for drug design. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 38, p. 25697-703, 2009.
- 37 MOTT, B. T. et al. Identification and optimization of inhibitors of Trypanosomal cysteine proteases: cruzain, rhodesain, and TbCatB. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 52-60, 2010.
- 38 SAJID, M. et al. Cruzain : the path from target validation to the clinic. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 712, p. 100-15, 2011.
- 39 MCGRATH, M. E. et al. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, n. 2, p. 251-9, 1995.
- 40 KHOURI, H. E. et al. A model to explain the pH-dependent specificity of cathepsin B-catalysed hydrolyses. **Biochemical Journal**, v. 275, n.3, p. 751-7, 1991.
- 41 MCKERROW, J. H. et al. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review Pathology**, v. 1, p. 497-536, 2006.
- 42 ATKINSON, H. J.; BABBITT, P. C.; SAJID, M. The global cysteine peptidase landscape in parasites. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 12, p. 573-81, 2009.
- 43 ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1824, n. 1, p. 195-206, 2012.
- 44 MCKERROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 263-269, 2009.
- 45 ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi*: um parasita, dois parasitas ou vários parasitas da doença de chagas?. **Revista da Biologia**, v. 6b, n. 1, p. 44-48, 2011.

- 46 LIMA, L. et al. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38385, 2012.
- 47 CERNY, N. et al. Coadministration of cruzipain and GM-CSF DNAs, a new immunotherapeutic vaccine against *Trypanosoma cruzi* infection. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 12, n. 2, p. 438-450, 2016.
- 48 JUDICE, W. A. et al. Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 24, p. 6578-86, 2001.
- 49 MARTINEZ-MAYORGA, K. et al. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 890-8, 2015.
- 50 HARTH, G. et al. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 58, n. 1, p. 17-24, 1993.
- 51 BARR, S. C. et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5160-1, 2005..
- 52 EAKIN, A. E. et al. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 9, p. 6115-8, 1993.
- 53 TROSSINI, G. H. et al. Quantitative structure-activity relationships for a series of inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*: molecular modeling, CoMFA and CoMSIA studies. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 28, n. 1, p. 3-11, 2009.
- 54 GUIDO, R. V. et al. Structure-activity relationships for a class of selective inhibitors of the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 964-73, 2008.
- 55 BRAK, K. et al. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 20, p. 6404-10, 2008.
- 56 DU, X. et al. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry & Biology**, v. 7, n. 9, p. 733-42, 2000.
- 57 NDAO, M. et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1167-78, 2014.
- 58 LE GALL, C.; BONNELYE, E.; CLÉZARDIN, P. Cathepsin K inhibitors as treatment of bone metastasis. **Current Opinion in Support and Palliative Care**, v. 2, n. 3, p. 218-22, 2008.
- 59 GAUTHIER, J. Y. et al. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 923-8, 2008.

- 60 GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Modern drug discovery technologies: opportunities and challenges in lead discovery. **Combinatorial Chemistry and High Throughput Screen**, v. 14, n. 10, p. 830-9, 2011.
- 61 TEOTICO, D. G. et al. Docking for fragment inhibitors of AmpC beta-lactamase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 18, p. 7455-60, 2009.
- 62 WOODHEAD, A. J. et al. Discovery of (2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-[5-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-1,3-dihydroisoindol-2-yl]methanone (AT13387), a novel inhibitor of the molecular chaperone Hsp90 by fragment based drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 5956-69, 2010.
- 63 O'HARE, T. et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. **Cancer Cell**, v. 16, n. 5, p. 401-12, 2009.
- 64 HAJDUK, P. J.; GREER, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 211-9, 2007.
- 65 MURRAY, C. W. et al. Fragment-based drug discovery applied to Hsp90. Discovery of two lead series with high ligand efficiency. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 16, p. 5942-55, 2010.
- 66 CHESSARI, G.; WOODHEAD, A. J. From fragment to clinical candidate--a historical perspective. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 13-14, p. 668-75, 2009.
- 67 OVERINGTON, J. P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A. L. How many drug targets are there? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 12, p. 993-6, 2006.
- 68 GLEESON, M. P. et al. Probing the links between *in vitro* potency, ADMET and physicochemical parameters. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 197-208, 2011.
- 69 PECK, R. W. Driving earlier clinical attrition: if you want to find the needle, burn down the haystack. Considerations for biomarker development. **Drug Discovery Today**, v. 12, n. 7-8, p. 289-94, 2007.
- 70 PAUL, S. M. et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 203-14, 2010.
- 71 EDDERSHAW, P. J.; BERESFORD, A. P.; BAYLISS, M. K. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 9, p. 409-414, 2000.
- 72 WANG, J.; SKOLNIK, S. Recent advances in physicochemical and ADMET profiling in drug discovery. **Chemistry & Biodiversity**, v. 6, n. 11, p. 1887-99, 2009.
- 73 WANG, J.; URBAN, L.; BOJANIC, D. Maximising use of *in vitro* ADMET tools to predict *in vivo* bioavailability and safety. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 3, n. 5, p. 641-65, 2007.

- 74 WANG, J. Comprehensive assessment of ADMET risks in drug discovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 19, p. 2195-219, 2009.
- 75 KALGUTKAR, A. S. et al. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. **Current Drug Metabolism**, v. 6, n. 3, p. 161-225, 2005.
- 76 KESERÜ, G. M.; MAKARA, G. M. The influence of lead discovery strategies on the properties of drug candidates. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 3, p. 203-12, 2009.
- 77 DI, L.; KERNS, E. H. Application of pharmaceutical profiling assays for optimization of drug-like properties. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v. 8, n. 4, p. 495-504, 2005.
- 78 MCGINNITY, D. F. et al. Evaluation of human pharmacokinetics, therapeutic dose and exposure predictions using marketed oral drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 5, p. 463-79, 2007.
- 79 JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727-48, Apr 1997.
- 80 GERSHKOVICH, A. A.; KHOLODOVYCH, V. V. Fluorogenic substrates for proteases based on intramolecular fluorescence energy transfer (IFETS). **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 33, n. 3, p. 135-62, 1996.
- 81 FENG, B. Y.; SHOICHET, B. K. A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 550-3, 2006.
- 82 MLADENOVIC, M. et al. On the origin of the stabilization of the zwitterionic resting state of cysteine proteases: a theoretical study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 27, p. 8696-705, 2008.
- 83 CLARK, M.; CRAMER III, R. D.; VAN OPDENBOSCH, N. Validation of the general purpose tripos 5.2 force field **Journal of Computational Chemistry**, v. 10, n. 8, p. 982-1012, 1989.
- 84 POWELL, M. J. D. Restart procedures for conjugate gradient method. **Mathematical Programming**, v. 12, n. 2, p. 241-254, 1977.
- 85 GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity - a rapid access to atomic charges. **Tetrahedron**, v. 36, n. 22, p. 3219-3228, 1980.
- 86 BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592-7, 1996.
- 87 ROMANHA, A. J. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233-8, 2010.

- 88 BARLTROP, J. A. et al. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, n. 1, p. 611–614, 1991.
- 89 PLANT, N. Strategies for using *in vitro* screens in drug metabolism. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 7, p. 328-36, 2004.
- 90 BARANCZEWSKI, P. et al. Introduction to *in vitro* estimation of metabolic stability and drug interactions of new chemical entities in drug discovery and development. **Pharmacological Reports**, v. 58, n. 4, p. 453-72, 2006.
- 91 PROCTOR, N. J.; TUCKER, G. T.; ROSTAMI-HODJEGAN, A. Predicting drug clearance from recombinantly expressed CYPs: intersystem extrapolation factors. **Xenobiotica**, v. 34, n. 2, p. 151-78, 2004.
- 92 MINERS, J. O.; MACKENZIE, P. I.; KNIGHTS, K. M. The prediction of drug-glucuronidation parameters in humans: UDP-glucuronosyltransferase enzyme-selective substrate and inhibitor probes for reaction phenotyping and *in vitro-in vivo* extrapolation of drug clearance and drug-drug interaction potential. **Drug Metabolism Reviews**, v. 42, n. 1, p. 196-208, 2010.
- 93 WALSKY, R. L. et al. Optimized assays for human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) activities: altered alamethicin concentration and utility to screen for UGT inhibitors. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 40, n. 5, p. 1051-65, 2012.
- 94 CHU, V. et al. *In vitro* and *in vivo* induction of cytochrome p450: a survey of the current practices and recommendations: a pharmaceutical research and manufacturers of america perspective. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 37, n. 7, p. 1339-54, 2009.
- 95 OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and nonspecific binding to microsomes. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 27, n. 11, p. 1350-9, 1999.
- 96 MCGINNITY, D. F. et al. Evaluation of fresh and cryopreserved hepatocytes as *in vitro* drug metabolism tools for the prediction of metabolic clearance. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 32, n. 11, p. 1247-53, 2004.
- 97 RILEY, R. J.; MCGINNITY, D. F.; AUSTIN, R. P. A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from *in vitro* intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 33, n. 9, p. 1304-11, 2005.
- 98 HOUSTON, J. B. Relevance of *in vitro* kinetic parameters to *in vivo* metabolism of xenobiotics. **Toxicology In Vitro**, v. 8, n. 4, p. 507-12, 1994.
- 99 DAVIES, B.; MORRIS, T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 7, p. 1093-5, 1993.

100 BARTER, Z. E. et al. Scaling factors for the extrapolation of *in vivo* metabolic drug clearance from *in vitro* data: reaching a consensus on values of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 1, p. 33-45, 2007.

101 IWATSUBO, T.; SUZUKI, H.; SUGIYAMA, Y. Prediction of species differences (rats, dogs, humans) in the *in vivo* metabolic clearance of YM796 by the liver from *in vitro* data. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 283, n. 2, p. 462-9, 1997.

102 LIU, X.; JIA, L. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (I): analytical systems and *in vivo* studies. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 8, p. 815-21, 2007.

103 JIA, L.; LIU, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *in vitro* experiments. **Current Drug Metabolism**, v. 8, n. 8, p. 822-9, 2007.

104 STRINGER, R. A. et al. Evaluation of recombinant cytochrome P450 enzymes as an *in vitro* system for metabolic clearance predictions. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 37, n. 5, p. 1025-34, 2009.

105 LECLUYSE, E. L.; ALEXANDRE, E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. **Methods in Molecular Biology**, v. 640, p. 57-82, 2010.

106 SOARS, M. G.; BURCHELL, B.; RILEY, R. J. *In vitro* analysis of human drug glucuronidation and prediction of *in vivo* metabolic clearance. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 301, n. 1, p. 382-90, 2002.

107 SHIBATA, Y. et al. Prediction of hepatic clearance and availability by cryopreserved human hepatocytes: an application of serum incubation method. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 30, n. 8, p. 892-6, 2002.

108 LAU, Y. Y. et al. Development of a novel *in vitro* model to predict hepatic clearance using fresh, cryopreserved, and sandwich-cultured hepatocytes. **Drug Metabolism & Disposition**, v. 30, n. 12, p. 1446-54, 2002.

109 HOUSTON, J. B. Utility of *in vitro* drug metabolism data in predicting *in vivo* metabolic clearance. **Biochemical Pharmacology**, v. 47, n. 9, p. 1469-79, 1994.

110 SOHLENIUS-STERNBECK, A. K. Determination of the hepatocellularity number for human, dog, rabbit, rat and mouse livers from protein concentration measurements. **Toxicology In Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1582-6, 2006.

111 YU, H. et al. A new PAMPA model proposed on the basis of a synthetic phospholipid membrane. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0116502, 2015.

112 WOHNSLAND, F.; FALLER, B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 923-30, 2001.

113 DI, L.; KERNS, E. H. Profiling drug-like properties in discovery research. **Current Opin Chemical Biology**, v. 7, n. 3, p. 402-8, 2003.

114 COON, M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 1-25, 2005.

115 MEUNIER, B.; DE VISSER, S. P.; SHAIK, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3947-80, 2004.

116 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Parasites**: American *trypanosomiasis* (also known as Chagas Disease). Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em 23 jan. 2014.

117 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Map production**: control of neglected tropical diseases. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png>. Acesso em: 23 jan. 2014.