

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

***Ensaio bioquímico e celulares para a identificação de  
novos inibidores de TcGAPDH seletivos à HsGAPDH***

Fabyana Aparecida Soares\*

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do título  
de MESTRE EM QUÍMICA, área de  
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

\*Bolsista CNPq

**São Carlos - SP  
2011**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S676eb

Soares, Fabyana Aparecida.

Ensaio bioquímico e celular para a identificação de novos inibidores de TcGAPDH seletivos à HsGAPDH / Fabyana Aparecida Soares. -- São Carlos : UFSCar, 2011. 70 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Química orgânica. 2. Calorimetria de titulação isotérmica. 3. Chagas, Doença de. 4. GADPH. I. Título.

CDD: 547 (20<sup>a</sup>)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
*Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia*  
*Departamento de Química*  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**  
**Curso de Mestrado Acadêmico**

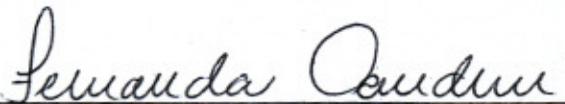
---

*Assinaturas dos membros da banca examinadora que avaliaram e aprovaram a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata **Fabyana Aparecida Soares**, realizada em 11 de agosto de 2011:*



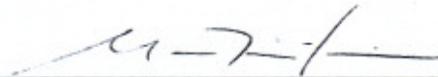
---

Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari



---

Profa. Dra. Fernanda Canduri



---

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Sebastião Soares Chaves e Orânia José da Silva Chaves, minha irmã Patrícia da Silva Soares e meu namorado Ricardo Rodrigues Goulart.

## AGRADECIMENTO

Primeiramente, agradeço a Deus por me permitir chegar ao fim de mais uma etapa da minha vida e por me acompanhar durante todo o caminho.

Agradeço a todos meus amigos: Fran, Gued, Tião, Toni, Sara, Guilherme, Kariny, Leandro, Jean, Amanda, pelos momentos de descontração e imensa alegria. E um agradecimento especial as minhas mais que amadas amigas Dany e Vi por serem minha fortaleza, por ser as pessoas com as quais eu sempre posso contar quando meus familiares estão longe.

Ao meu mozim (Ricardo), por estar sempre ao meu lado, por ser muito mais que um namorado e sim um companheiro, alguém que sempre me apóia, que está sempre ao meu lado, obrigada pela paciência, pelos conselhos, pelas dicas, por estar sempre comigo até mesmo nas madrugadas e finais de semana no laboratório.

Agradeço a todo grupo NEQUIMED-PN – Josmar, Igor, Geraldo, Fabiana, Leandro, Willian, Helton – em especial a Emanuella Barreto que sempre me ajudou quando precisei.

Agradeço ao Prof. Dr. Andrei Leitão por ter me ajudado a tornar possível a conclusão deste trabalho, por toda sua dedicação e auxílio na concretização de importantes etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari pela orientação e por ter depositado sua confiança em mim para realização deste trabalho.

Ao grupo do Laboratório de Nucleosídeos, Heterociclos e Carboidratos – LNHC da Universidade Federal Fluminense (UFF), coordenado pela Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Cecília Bastos Vieira de Souza por ter cedido os compostos que foram analisados neste trabalho.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP) pela autorização para o desenvolvimento do trabalho em suas dependências.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

E por fim agradeço aos meus pais e minha irmã por todo carinho, toda paciência, pelo apoio incondicional e todo apoio nos momentos difíceis, peço desculpa pelos momentos de ausência.

## EPÍGRAFE

"É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

## RESUMO

### ENSAIOS BIOQUÍMICOS E CELULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS INIBIDORES DE *Tc*GAPDH SELETIVOS À *Hs*GAPDH

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada que afeta aproximadamente 10 milhões de indivíduos, no ano de 2008 foi responsável pela morte de cerca de 10 mil pessoas. Os tratamentos que existem atualmente são empregados apenas na fase aguda da doença, utilizando os fármacos benzonidazol e o nifurtimox, demonstrando ambos diversos efeitos indesejáveis. Apesar da existência de alguns estudos na área, não há registro de nenhum novo fármaco para o tratamento da doença de Chagas. Dessa forma, a busca por novas moléculas bioativas para o tratamento desta doença é de fundamental importância. A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) de *Trypanosoma cruzi* aparece como um alvo promissor para pesquisa de novos fármacos para doença de Chagas, uma vez que essa enzima participa da via glicolítica, que a principal via para obtenção de energia do parasito. Neste trabalho foram realizados ensaios de inibição utilizando uma classe de compostos contra a *Tc*GAPDH. A técnica utilizada para o estudo dos compostos foi a calorimetria de titulação isotérmica (ITC), que mede a troca de calor observada durante uma reação e vem sendo utilizada atualmente para a determinação de parâmetros termodinâmicos e cinéticos. Os compostos estudados apresentaram atividade inibitória frente à enzima *Tc*GAPDH e sua homóloga GAPDH de humanos. Foram estudados oito compostos análogos ao cofator  $\text{NAD}^+$ . Os valores da constante de inibição aparente ( $K_i^{app}$ ) dos compostos estão no intervalo de 15,98 a 91,25  $\mu\text{M}$  com mecanismo de inibição competitivo. A descoberta e desenvolvimento de fármacos baseiam-se em sistemas modelos introduzidos no início dos projetos em química medicinal. A otimização *in vitro* usando ensaios bioquímicos e cultura de células representa

uma opção viável no novo paradigma da química medicinal moderna. No caso dos estudos celulares, modelos são estudados para mimetizar as células humanas, especialmente com relação a atividade da GAPDH. Dessa forma, o *Saccharomyces cerevisiae* foi usado como modelo para que a atividade citotóxica dos compostos fosse detectada por espectroscopia de fluorescência. Cinco dos oito compostos não apresentaram atividade contra a levedura, sendo um bom indicativo que as moléculas apresentam baixa citotoxicidade tornando-as candidatas para os estudos *in vitro* no parasito *T.cruzi*.

## ABSTRACT

### BIOCHEMICAL AND CELLULAR ASSAYS TO IDENTIFY NEW INHIBITORS OF *Tc*GAPDH SELECTIVES TO *Hs*GAPDH.

Chagas disease is a tropical neglected illness; nearly 10 million people are infected, in 2008 it was responsible for the deaths of about 10 thousand people. At present, only two medicines (benznidazol and nifurtimox) are available to treat this disease and they lack of efficacy/safety in chronic phase. This scenario is changing due to advances in the search for new trypanocidal agents. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), a glycolytic enzyme of *Trypanosoma cruzi* appears as a suitable target for drug discovery. In the present work, a kinetic study using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) were carried out to investigate the activity of eight NAD<sup>+</sup> analogs against GAPDH. ITC was been used to measure the heat exchange during reactions making it a powerful tool of identification of bioactive compounds. Study compounds showed inhibitory activity on *Tc*GAPDH enzyme and its homologous human GAPDH. The apparent inhibition constant values ( $K_i^{app}$ ) were in the range from 15,98 to 91,25  $\mu$ M describing competitive inhibition mechanisms. Important steps in medicinal chemistry maybe biochemical followed by cell-based assays were, for instance, *Saccharomyces cerevisiae* could be used as a model to assess the cytotoxic activity of compounds. The technique used to study the action of chemical compounds in yeast was the fluorescence spectroscopy. Five out of eight compounds showed no activity against *S. cerevisiae*. This is a good indication that study compounds have low cytotoxicity, which makes them candidates for *in vitro* studies on the parasite.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Etapas da descoberta e desenvolvimento de fármacos.[7].....	3
Figura 1.2. Distribuição geográfica de casos de doença de Chagas fora das regiões edêmicas e representação dos movimentos migratórios que levam essa doença a diferentes regiões do planeta.[14].....	5
Figura 1.3. Ciclo de vida do parasito <i>T. cruzi</i> . [17, 21].....	6
Figura 1.4. Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas..	7
Figura 1.5. Representação esquemática da reação catalisada pela enzima GAPDH.....	11
Figura 1.6. Esquematização do mecanismo da reação da enzima GAPDH. (1) Formação do complexo enzima-substrato. (2) Formação do intermediário hemitioacetil, facilitado pela catálise ácido-base promovida pela His194. (3) Formação do intermediário tioéster pela redução do $\text{NAD}^+$ a $\text{NADH}$ . (4) Saída do $\text{NADH}$ e posterior entrada de $\text{NAD}^+$ no sítio ativo da GAPDH e ataque nucleofílico do fosfato inorgânico ao grupo tioéster levando à (5) liberação do produto 1,3-BPG.....	12
Figura 1.7. Representação em fitas (a) das quatro cadeias da enzima GAPDH e (b) dos domínios $\text{NAD}^+$ e catalítico.[18].....	13
Figura 1.8. Representação de uma curva típica de Michaelis-Menten.....	16
Figura 1.9. Representação esquemática da inibição competitiva.....	18
Figura 1.10. Gráfico de Lineweaver-Burk de uma inibição competitiva. A intersecção com o eixo Y é constante e igual a $1/V_{max}$ , mas a inclinação das retas ( $K_M/V_{max}$ ) e a intersecção com o eixo X (correspondente a $-1/K_M$ ) se alteram com o aumento da [I]..	20
Figura 1.11. Representação esquemática da inibição não-competitiva.....	21
Figura 1.12. Gráfico Lineweaver-Burk de uma inibição não-competitiva. Tanto a intersecção com o eixo Y quanto a inclinação das retas ( $K_M/V_{max}$ ) variam de acordo com a [I]. Todas as retas interceptam o eixo X (correspondente a $-1/K_M$ ) no mesmo ponto independente da [I]..	21
Figura 1.13. Representação esquemática da inibição incompetitiva.....	22
Figura 1.14. Gráfico Lineweaver-Burk de uma inibição incompetitiva. A diminuição do valor de $V_{max}$ é refletida através de diferentes intersecções no eixo Y para concentrações crescentes de inibidor. A intersecção com o eixo X também varia com a [I], fornecendo diferentes valores do termo $-1/K_M$ evidenciando que o valor de $K_M$ também diminui para esse tipo de inibição.....	23
Figura 1.15. Representação de um calorímetro de Titulação Isotérmica: (a) celas de referência e amostra que são mantidas na mesma temperatura no início do experimento. (b) Ao se iniciar a titulação ocorre variação na temperatura da cela de amostra, levando a uma variação da energia fornecida a esta cela, mantendo assim a diferença de temperatura entre as celas iguais a zero. Figura adaptada.[50].....	24
Figura 1.16. Representação gráfica de uma curva típica da velocidade de uma reação obtida no ITC: potência térmica versus o tempo.[48].....	27

Figura 1.17. Micrografia das células de <i>S. cerevisiae</i> depois de serem expostas ao corante. Setas 1: células metabolicamente ativas; Seta 2: células metabolicamente inativa.....	32
Figura 3.1. Representação da placa de 96 poços para ensaio de determinação da concentração de fluoróforo. Região em verde = água; Região em vermelho = célula + fluoróforo; Região em amarelo: tampão + fluoróforo, Região em azul: célula e tampão (corresponde ao branco).....	40
Figura 4.1. (A) curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH. (B) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten.....	42
Figura 0.1. Estruturas das moléculas análogas ao $Nad^+$ testadas contra a enzima TcGAPDH.....	44
Figura 4.3. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição competitivo contra a enzima TcGAPDH no sítio do $NAD^+$ . Curva em azul: experimento controle ( $I = 0$ ), Curva em vermelho: concentração do inibidor igual a 50 $\mu M$ . ....	46
Figura 4.4. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição competitivo contra a enzima TcGAPDH no sítio do $NAD^+$ . Curva em azul: experimento controle ( $I = 0$ ); Curva em vermelho: concentração do inibidor igual a 50 $\mu M$ ; Curva em verde : concentração do inibidor igual a 100 $\mu M$ . ....	48
Figura 4.5. Ajuste de Eadie-Hofstee do Nequimed136.....	50
Figura 4.6. Ajuste não linear do composto Nequimed136.....	52
Figura 4.7. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição competitivo contra a enzima TcGAPDH no sítio do G3P. Curva em azul: experimento controle ( $I = 0$ ); Curva em vermelho: concentração do inibidor igual a 50 $\mu M$ . ....	54
Figura 4.8. Evolução do ligante a composto-matriz partindo de diferentes espaços químicos. Figura adaptada.....	56
Figura 4.9. Representação gráfica do estudo com tampão. Curva preta: acetato pH 5,0; Curva Verde: citrato pH 5,0; Curva vermelha: acetato pH 4,0. ....	60
Figura 4.10. Representação gráfica (a) número de células e (b) absorvância. Curva preta: acetato pH 5,0; Curva verde: citrato pH 5,0; Curva vermelha: acetato pH 4,0.....	60
Figura 4.11. Representação gráfica do estudo e diferentes concentrações do fluoróforo FUN-1. Curva preta: controle (FUN-1 = 0); Curva vermelha: fluoróforo 20 $\mu M$ ; Curva verde: fluoróforo 10 $\mu M$ ; Curva azul: fluoróforo 5 $\mu M$ ; Curva ciano: 2,5 $\mu M$ . ....	61
Figura 4.12. Representação gráfica do ensaio celular dos compostos na concentração de 500 $\mu M$ . ....	62
Figura 4.13. Representação gráfica para o estudo com diferentes concentrações do composto Nequimed137. Curva preta: controle (Nequimed137 = 0 $\mu M$ ); Curva Vermelha: Nequimed137 = 500 $\mu M$ ; Curva Verde: Nequimed137 = 250 $\mu M$ ; Curva Azul: Nequimed137 = 125 $\mu M$ ; Curva Ciano: Nequimed137 = 62,5 $\mu M$ ; Curva Rosa: Nequimed137 = 31,25 $\mu M$ ; Curva Amarela: Nequimed137 = 15,625 $\mu M$ ; Curva Verde Musgo: Nequimed137 = 7,8125 $\mu M$ .....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Enzimas envolvidas no controle da glicólise, cuja inibição leva a uma redução de 50% do fluxo glicolítico. ....	9
Tabela 4.1. Constantes cinéticas calculadas para a enzima <i>Tc</i> GAPDH em relação ao cofator NAD <sup>+</sup> .....	42
Tabela 4.2. Valores de $K_i^{app}$ , $K_M$ e mecanismo de inibição .....	444
Tabela 4.3. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais. ....	44
Tabela 4.4. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais. ....	49
Tabela 4.5. Parâmetros do estudo de cooperatividade do composto Neuimed136 .....	50
Tabela 4.6. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais. ....	50
Tabela 4.7. Constantes cinéticas para a enzima <i>Tc</i> GAPDH em relação ao substrato G3P .....	52
Tabela 4.8. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais e os valores de $K_i^{app}$ (em $\mu$ M) das substâncias testadas contra a <i>Tc</i> GAPDH no sítio de ligação do G3P. ....	54
Tabela 4.9. Eficiência do ligante dos inibidores da <i>Tc</i> GAPDH. ....	56
Tabela 4.10. Valores de $K_i^{app}$ , $K_M$ e mecanismo de inibição .....	57
Tabela 4.11. Valores de $K_i^{app}$ , $K_M$ e mecanismo de inibição de <i>Hs</i> GAPDH .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$r^2$	ajuste linear do modelo
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
$\mu\text{L}$	microlitros
$\mu\text{M}$	micromolar
ADME	absorção, distribuição, metabolismo e excreção (etapas da fase farmacocinética de um fármaco)
ALD	aldolase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	trifosfato de adenosina
Cys166	resíduo de aminoácido cisteína e o número correspondente à sua posição na cadeia primária
Da	Daltons (unidade de massa molecular)
$\Delta G$	energia livre de Gibbs
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
BPG	1,3-bifosfoglicerato
E	enzima
EC	Comissão para classificação de enzimas
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EI	complexo enzima-inibidor
ES	complexo enzima-substrato
ESI	complexo enzima/substrato/inibidor
FDA	Food and Drug Administration
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDH	glicerol-1,3-fosfato desidrogenase
G3P	gliceraldeído-3-fosfato

HK	hexoquinase
His194	resíduo de aminoácido histidina e o número correspondente à sua posição na cadeia primária
<i>Hs</i> GAPDH	GAPDH de humanos
HTS	ensaios em larga escala
I	inibidor
IC <sub>50</sub>	metade da concentração inibitória máxima
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
K	Kelvin
$K_d$	constante de dissociação
kcal	kilocalorias
$k_{cat}$	constante catalítica
$K_d$	constante de dissociação
kDa	kiloDalton
$K_i$	constante de inibição
$K_M$	constante de Michaelis Menten
L	litros
LB	meio de cultura Luria Broth
LE	eficiência do ligante
mg	miligrama
mL	mililitros
mM	milimolar
MM	massa molecular
HAC	número de átomos diferente de hidrogênio
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
nM	nanomolar

OMS	Organização Mundial de Saúde
P	produto
PA	Para Análise (grau de pureza)
PDB	banco de dados de proteínas
PFK	6-fosfofrutoquinase
PGK	fosfoglicerato quinase
$pK_a$	logaritmo da constante de associação
PYK	6-fosfofrutoquinase
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
TIM	triosefosfato isomerase
S	substrato
Sy.x.	Desvio padrão dos resíduos
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>Tc</i> GAPDH	GAPDH de <i>Trypanosoma cruzi</i>
UV	ultravioleta
v/v	volume/volume
$v_i$	velocidade inicial sem inibidor
$V_{max}$	velocidade máxima

## Sumário

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XI
1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1    Química Medicinal .....	1
1.2    Doença de Chagas.....	4
1.3    Via Glicolítica.....	8
1.4    Alvos Enzimáticos .....	9
1.4.1    Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase (GAPDH) .....	10
1.5    Cinética Enzimática .....	12
1.6    Inibição Enzimática .....	16
1.6.1    Inibição competitiva .....	17
1.6.2    Inibição Não-competitiva .....	19
1.6.3    Inibição Incompetitiva.....	21
1.7    Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) .....	22
1.7.1    Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Interação Enzima-Inibidor através de ITC.....	23
1.8    Estudo Celular utilizando como organismo modelo a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	27
1.8.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
1.8.2    Ensaio Celular por Fluorimetria .....	29
1.8.2.1.    Ensaio celular utilizando o fluoróforo FUN-1.....	30
2            OBJETIVOS.....	32
2.1    Objetivo geral .....	32
2.2    Objetivos específicos .....	32
3            MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
3.1    Materiais .....	33
3.1.1    Ensaio cinéticos .....	33
3.1.2    Ensaio Celulares.....	33
3.2    Procedimento Experimental.....	34
3.2.1    Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima <i>TcGAPDH</i> .....	35
3.2.2    Ensaio de inibição .....	366
3.2.3    Ensaio de seletividade dos compostos frente à <i>HsGAPDH</i> .....	36
3.2.4    Análise dos dados .....	37
3.2.5    Ensaio Celular .....	37
3.2.5.1    Preparação do Meio.....	37

3.2.5.2	Crescimento das Células .....	38
3.2.5.3	Determinação da concentração do FUN-1 .....	38
3.2.5.4	Ensaio dos inibidores da GAPDH na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	39
3.2.5.5	Ensaio de dose-resposta do composto com atividade contra a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	41
4.1	Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima <i>TcGAPDH</i> .....	41
4.2	Determinação da constante e mecanismo de inibição dos compostos avaliados.....	42
4.3	Estudo da variação da concentração dos inibidores da enzima <i>TcGAPDH</i> .....	47
4.4	Estudo da inibição dos compostos frente ao G3P.....	52
4.5	Determinação da eficiência do ligante.....	54
4.6	Estudo da seletividade dos compostos análogos ao NAD <sup>+</sup> frente à GAPDH de humanos ( <i>HsGAPDH</i> ) .....	57
4.7	Estudo dos análogos nucleosídeos em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	58
4.7.1	Estudo do tampão e crescimento das células.....	58
4.7.2	Determinação da concentração de fluoróforo.....	60
4.7.3	Ensaio dos inibidores da GAPDH na <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	61
4.7.4	Ensaio Dose-Resposta para o composto Nequimed137 .....	62
	Conclusões.....	64
	Perspectivas.....	66
	Referência Bibliográfica.....	67

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 Química Medicinal

A definição de Química Medicinal pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (de sigla inglesa IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry): “ *é uma área do conhecimento com base em química, envolvendo a invenção, a preparação e a interpretação do mecanismo de ação molecular de compostos biologicamente ativos. Compreendendo também os estudos do metabolismo e das relações entre estrutura química e atividade*”. [1]

A Química Medicinal envolve inovação, descoberta e desenvolvimento de novas substâncias bioativas, síntese e modificação molecular, extração, isolamento, identificação e elucidação estrutural de princípios ativos naturais de plantas, animais ou minerais, descrição de moléculas desde a sua constituição atômica até suas características estruturais, interações destas substâncias com alvos biológicos de interesse terapêutico. [2] Portanto, a química medicinal é uma área do conhecimento que apresenta caráter inter e multidisciplinar, envolvendo matérias como Biofísica, Biologia Molecular, Bioquímica, Clínica Médica, Físico-Química, Fisiologia, Patologia, Química Biológica, Química Inorgânica, Química Orgânica e Química Quântica. [3]

Emil Fisher há aproximadamente 100 anos utilizou o exemplo da chave e fechadura para a compreensão da ação de uma enzima, o que posteriormente foi extrapolado para a ação de um fármaco. Dois pontos de extrema importância nas bases atuais da Química Medicinal é o reconhecimento do receptor pelo fármaco e o planejamento racional deste fármaco. [4]

O processo de descoberta e o desenvolvimento de um fármaco é dividido em duas grandes fases: (i) fase pré-clínica e (ii) fase clínica, [5] como mostrado na Figura 1.1

O processo de descoberta e desenvolvimento de um novo fármaco (Figura 1.1) inicia-se na fase pré-clínica pela identificação da necessidade de uma nova terapia, ou adequação dos tratamentos existentes, em conjunto com a identificação e validação do alvo terapêutico, podendo este ser um receptor, uma enzima, um canal iônico, proteínas de membrana, DNA/RNA ou um modelo celular. Esta é a primeira etapa para o sucesso posterior de um projeto em Química Medicinal, sendo assim, é imprescindível o conhecimento completo da fisiopatologia da doença.[6] Numa segunda etapa, ocorre a identificação de compostos químicos que possam intervir na função fisiológica do organismo humano ou do eventual parasita de forma a causar um efeito terapêutico adequado. Essa identificação pode ser feita por triagens reais ou virtuais, utilizando diferentes métodos em Química Medicinal. Em seguida são identificadas substâncias químicas que apresentem atividade biológica *in vitro* relevante, conhecidas como ligantes (do inglês, *hits*), e o teste em modelos biológicos apropriados de moléculas análogas. É então realizada a seleção de um ou mais compostos, denominados compostos-líderes (do inglês, *lead compound*), sendo estes candidatos a fármaco. Estes compostos serão então submetidos a testes toxicológicos em animais. Caso sejam aprovados em todos os testes, as informações referentes são submetidas ao órgão regulamentador do uso de medicamentos (a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA) para que possam ser efetuados os estudos clínicos em humanos.[7, 8]

Após todas essas etapas, inicia-se a fase clínica, que objetiva descobrir e verificar os efeitos farmacológicos e clínicos das substâncias selecionadas a fim de que estas se tornem aptas ao uso clínico. Esses ensaios podem assim ser divididos: ensaios clínicos da fase I, onde são avaliadas a tolerância e a toxicidade do candidato a fármaco em voluntários humanos saudáveis; ensaios clínicos II, que é o estabelecimento da eficácia e a dosagem para humanos; se o candidato a fármaco apresentar baixa toxicidade e alta eficiência é então submetido aos ensaios clínicos III, no qual são realizadas

triagens com milhares de pacientes para que uma avaliação mais confiável seja feita com relação à eficiência e as propriedades ADME. Se os candidatos a fármacos sobrevivem a todos esses ensaios, as informações acumuladas são submetidas ao órgão regulamentador que poderá aprovar o composto como fármaco. Por fim, chega-se a fase IV dos ensaios clínicos que ocorre depois que o fármaco seja lançado no mercado e tem a finalidade de descobrir efeitos adversos pouco frequentes, tendo grande importância nesse processo a farmacovigilância.[7, 8]

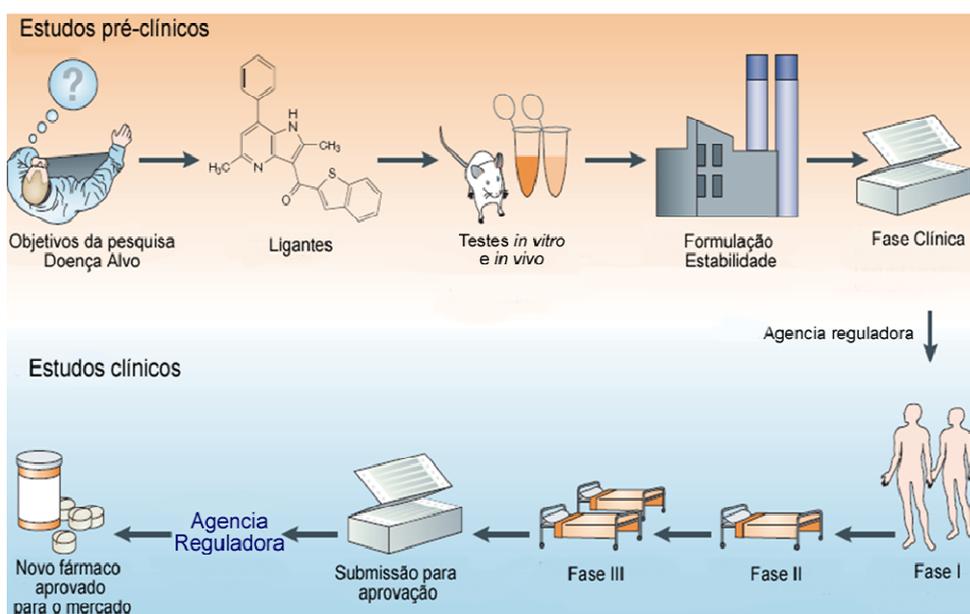


Figura 1.1. Etapas da descoberta e desenvolvimento de fármacos. [7]

A Química Medicinal tem como foco principal a escolha dos compostos para testes biológicos. Com o auxílio de várias ferramentas é possível explorar o imenso espaço químico delineando o trabalho de identificação, seleção e otimização destes compostos que irão interagir com o alvo molecular selecionado, sendo este último a representação do espaço biológico.[9] Portanto, a Química Medicinal representa a integração de tecnologias, a união entre métodos computacionais – como, por exemplo, o mapeamento do receptor, docagem molecular, dinâmica molecular – e métodos experimentais que vão desde a expressão e purificação de enzimas, passando por ensaios cinéticos e experimentos *in vivo*.

## 1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada. Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que há aproximadamente 10 milhões de indivíduos infectados na América Latina e mais de 25 milhões de pessoas estão sob risco de infecção. Apenas em 2008 ocorreram mais de 10 mil mortes causadas por complicações desta doença. [10] Foi descrita pela primeira vez pelo sanitarista brasileiro Carlos Chagas em 1909. Carlos Chagas descreveu suas manifestações clínicas, epidemiologia e todo ciclo de vida do vetor. [11, 12]

As primeiras campanhas para o controle da doença de Chagas ocorreram na Venezuela por volta de 1966 e no Brasil entre 1975 e 1983. No ano de 1990 foi classificada pelo Banco Mundial como a doença parasitária mais séria da América Latina, uma vez que os triatomíneos se adaptam em ambientes domésticos e os mesmos mostram alta capacidade de transmissão do parasito.[13]

O parasito *Trypanosoma cruzi*, causados da doença de Chagas, tem sido encontrado em regiões não endêmicas (Figura 1.2) como na América do Norte, Europa, Austrália e Japão. [14] A migração tem sido considerada uma das principais causas para disseminação da doença de Chagas para as regiões não endêmicas. Durante os anos 60 e 80 a agitação política e a estagnação econômica levou a emigração de latino-americanos para países desenvolvidos. O destino mais frequente foi os Estados Unidos, porém também ocorreu emigração para Austrália e Canadá. [15]

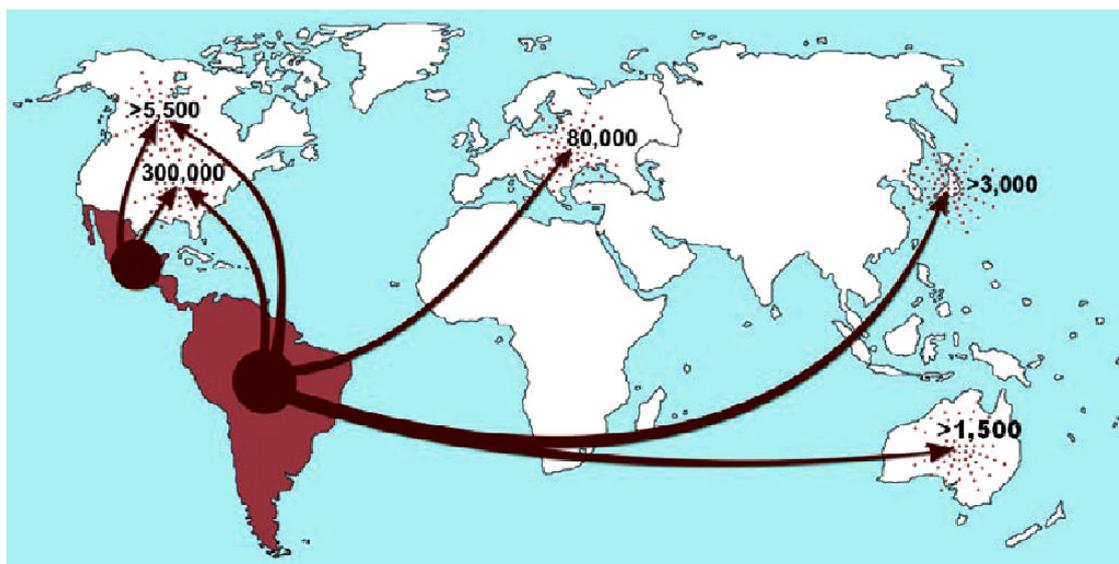


Figura 1.2. Distribuição geográfica de casos de doença de Chagas fora das regiões endêmicas e representação dos movimentos migratórios que levam essa doença a diferentes regiões do planeta. [14]

O protozoário *Trypanosoma cruzi*, possui um ciclo de vida que envolve dois hospedeiros intermediários e quatro estágios de desenvolvimento diferentes. [16] Seu ciclo de vida (Figura 1.3) [17] inicia-se quando a forma tripomastigota é ingerida pelo inseto (conhecido no Brasil como barbeiro), onde se transforma na forma epimastigota, que no intestino do parasito se desenvolve novamente para a forma tripomastigota.[18, 19]

O homem é infectado quando o barbeiro elimina suas fezes contendo os tripomastigotas metacíclicos que é a forma infectante e pode penetrar através das mucosas. Após a penetração, o tripomastigota metacíclico invade células alvo e perde flagelo, se transformando na forma amastigota. Neste estágio os amastigotas multiplicam-se por divisão binária até que a célula infectada se torne repleta das mesmas. Então os amastigotas transformam-se novamente em tripomastigotas. Ocorre o rompimento da célula alvo, liberando os tripomastigotas que irão infectar uma nova célula alvo, disseminando-se por todo o organismo através da circulação sanguínea e linfática. [20]

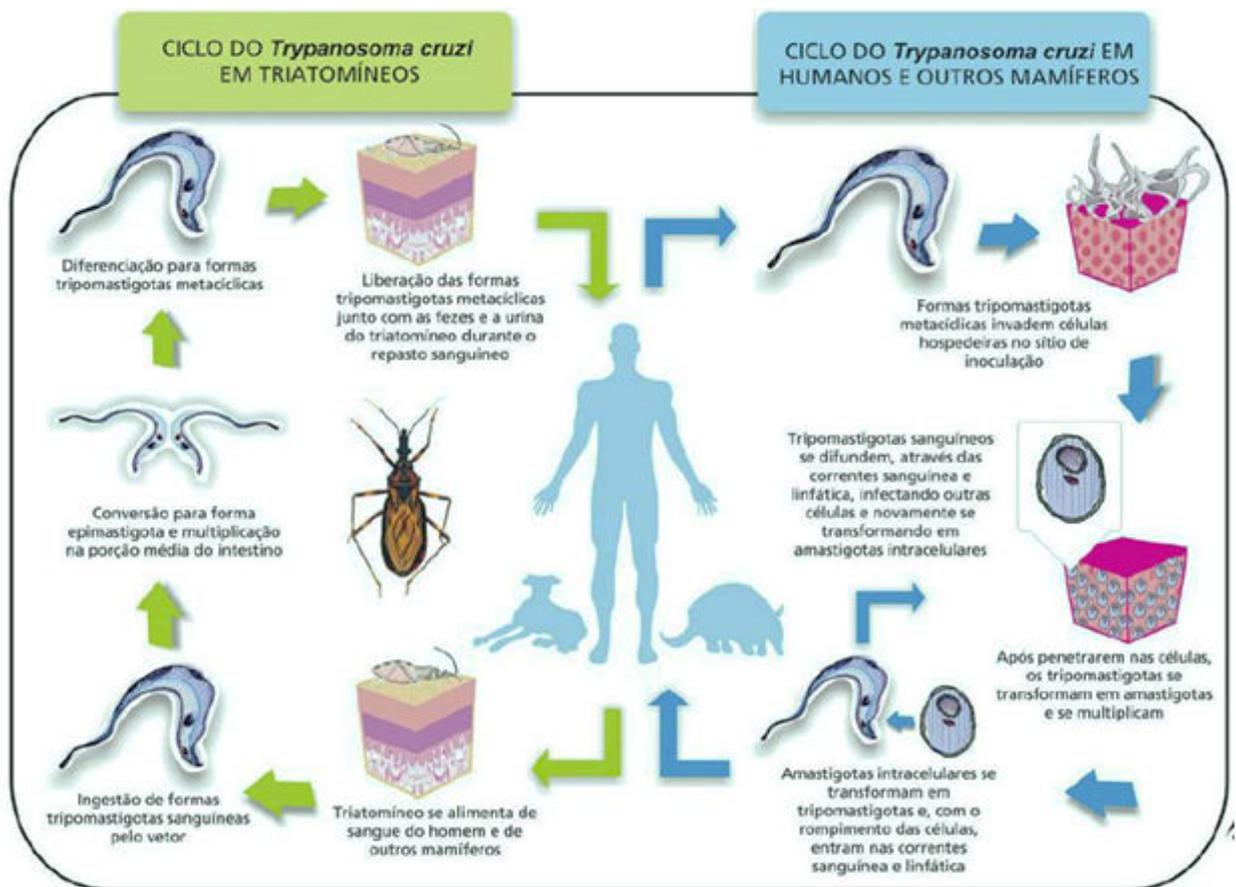


Figura 1.3. Ciclo de vida do parasito *T. cruzi*. [17, 21]

As formas de contaminação incluem transfusão sanguínea, transplante de órgãos e medula óssea, picada do inseto vetor, transmissão vertical materno-fetal, e recentemente foram relatados casos de transmissão alimentar, onde o inseto se encontrava macerado em meio a alimentos. [22]

A doença de Chagas apresenta duas fases: aguda e crônica. [23] A fase aguda tem duração de cerca de 2 meses e se inicia de 6 a 10 dias após a contaminação. Geralmente, a fase aguda da doença apresenta manifestações clínicas discretas, principalmente em adultos. Muitas vezes, a fase aguda passa despercebida, com sintomas típicos do mal-estar geral observado em outras infecções. Quando ocorre a manifestação de uma fase aguda clássica, os sintomas são inflamação na região da infecção, inchaço das pálpebras, quadro febril e outras manifestações clínicas como miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. [24] A fase aguda sintomática ocorre principalmente em crianças antes dos 15 anos, e podendo

levar a morte devido a complicações relacionadas a insuficiência cardíaca e meningoencefalite que é um processo inflamatório que envolve o cérebro. [25, 26]

Após a fase aguda ocorre uma fase indeterminada, assintomática, em que 70-85% das pessoas contaminadas pela doença de Chagas permanecem nesta fase pelo resto de suas vidas. Porém 15-30% dos pacientes desenvolvem lesões de órgãos, produzindo as formas cardíaca, digestiva, nervosa, que são manifestações da fase crônica da doença, que ocorre em torno de 10-25 anos após a infecção inicial. Os principais sintomas são palpitações, tonturas, arritmias, insuficiência cardíaca, podendo chegar até mesmo a morte súbita. [25, 26]

Vários anti-tripanosomatídeos foram descobertos no início do século passado, sendo desenvolvidos inicialmente para outras indicações farmacológicas. Atualmente os fármacos utilizados no tratamento são o benzonidazol e o nifurtimox (Figura 1.4), que apresentam eficácia limitada à fase aguda da doença, apresentando ambos diversos efeitos indesejáveis, tais como anorexia, perda de peso, mudanças psicológicas, excitabilidade, tremores musculares, sonolência, alucinações, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia e convulsões. [27, 28] O nifurtimox não é mais comercializado no Brasil. Além do aparecimento destes efeitos indesejáveis, ocorre o aumento de cepas resistentes aos fármacos. [29]

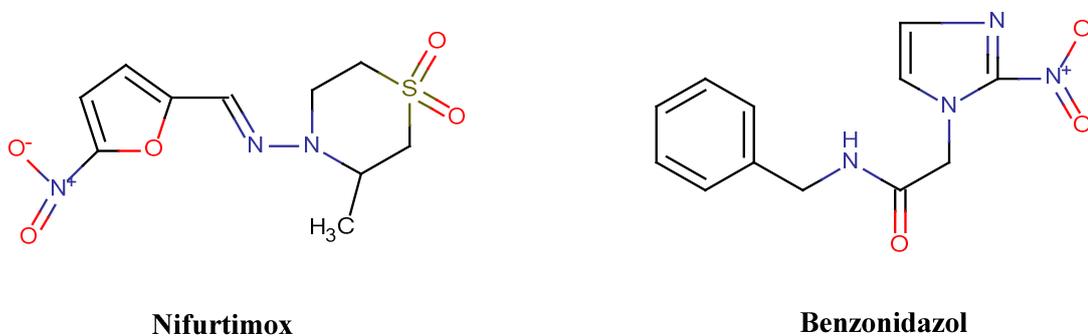


Figura 1.4. Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.

O mecanismo de ação proposto para estes dois fármacos é através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofilicos. O grupo nitro de ambos os fármacos é reduzido a um grupo amino pela ação de nitrorredutases, com a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofilicos.[30, 31]

Apesar da existência de alguns estudos na área, não há registro de nenhum novo fármaco para o tratamento da doença de Chagas. Dessa forma, a busca por novas moléculas bioativas para o tratamento desta doença é de fundamental importância.

### **1.3 Via Glicolítica**

Uma abordagem promissora para realizar essa tarefa é a inibição seletiva das enzimas que participam da via glicolítica do parasita, uma vez que os tripanossomatídeos são altamente dependentes da glicólise para produção de ATP. [32] Nos tripanossomatídeos a glicólise ocorre em uma organela especializada chamada *glicossomo*. No glicossomo estão presentes sete das dez enzimas que participam da conversão da glicose em piruvato: hexoquinase (HK), glicose 6-fosfato-isomerase; 6-fosfofrutoquinase (PFK), 1,6-difosfato aldolase (ALD), triosefosfato isomerase (TIM), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a fosfoglicerato quinase (PGK). [33]

Bakker *et. al.* (1999) identificaram os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas. Para tanto, foram utilizados modelos matemáticos para calcular quais as etapas da glicólise precisam ser menos inibidas para induzir a inibição de certa quantidade do fluxo glicolítico. [34] A Tabela 1.1 reporta a porcentagem em que cada enzima da glicólise precisa ser inibida para que o fluxo glicolítico diminua em 50%.

A enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase exerce papel significativo no controle do fluxo glicolítico. A inibição dessa enzima em 84% provoca a redução do fluxo glicolítico em 50%. Outro ponto importante é que

um modelo elaborado da glicólise em eritrócitos humanos mostrou que uma deficiência de 95% das enzimas ALD, PGK e GAPDH não provoca nenhum sintoma clínico. [34]

Tabela 1.1. Enzimas envolvidas no controle da glicólise, cuja inibição leva a uma redução de 50% do fluxo glicolítico.

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

\*ALD, frutose-1,6-difosfato aldolase; GDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato quinase; HK, hexoquinase; PFK, 6-fosfofrutoquinase; PYK, piruvato quinase.

Estudos realizados por Engel *et. al.*(1987) mostraram que uma cultura da forma amastigota do *T. cruzi* possui um metabolismo essencialmente glicolítico, e que a mesma adquire a habilidade de oxidar substratos, tais como aminoácidos, somente após a diferenciação para a forma epimastigota.[35] Essa forte dependência dos tripanossomatídeos pela via glicolítica para a obtenção de energia explica o motivo pelo qual as enzimas desta via se tornaram alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.[33, 36]

## 1.4 Alvos Enzimáticos

Enzimas são biocatalisadores, com elevada seletividade e/ou especificidade, propriedades que lhes permitem a realização de uma grande

variedade de processos bioquímicos. Sua especificidade é baseada nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima, interações estas que podem ocorrer através de ligações de hidrogênio, interações de van der Waals e interações eletrostáticas. [37]

As enzimas, devido ao seu papel essencial em vias bioquímicas associadas a doenças e disfunções humanas são alvos biológicos de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos. Essa importância das enzimas no tratamento de doenças e no processo de descoberta de fármacos pode ser demonstrada pelo número de fármacos em uso clínico que atuam como inibidores enzimáticos. [9, 37]

### 1.4.1 Gliceraldeído-3-Fosfato-Desidrogenase (GAPDH)

Estudos recentes têm permitido a identificação de alvos potenciais em *T. cruzi*, dentre estes alvos encontra-se a enzima Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase (GAPDH).

A GAPDH é uma enzima que catalisa a reação que corresponde à sexta etapa da via glicolítica, convertendo gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bifosfoglicerato (1,3-BPG) e concomitantemente reduzindo  $\text{NAD}^+$  à NADH (Figura 1.5). Esta enzima é um homotetrâmero com massa molecular de aproximadamente 156 kDa. Cada uma de suas subunidades é constituída de dois domínios – o domínio de ligação do  $\text{NAD}^+$  e o domínio catalítico. [38]

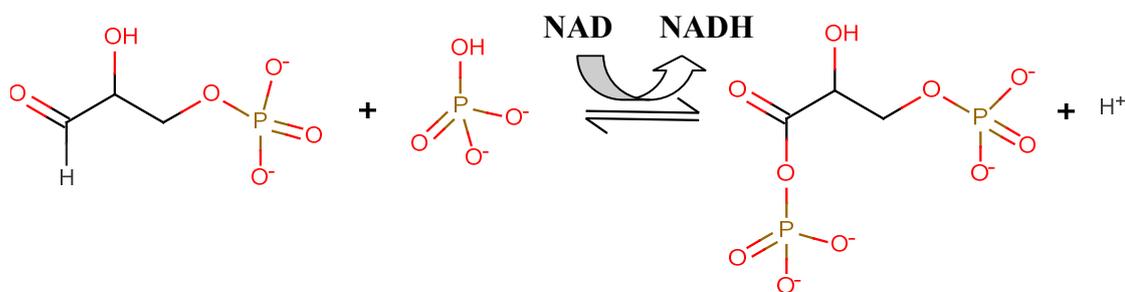


Figura 1.5. Representação esquemática da reação catalisada pela enzima GAPDH.

O mecanismo da reação da GAPDH (Figura 1.6) ocorre no seu sítio ativo e envolve o ataque nucleofílico da cisteína catalítica (Cys166) através do seu grupo sulfidríla ( $-SH$ ), ao carbono carbonílico do G3P formando um intermediário tetraédrico hemitioacetil. A His194 é outro resíduo que participa diretamente da catálise e atua como uma base responsável por ativar a Cys166 e assim facilitando a formação do intermediário tetraédrico. Este intermediário é decomposto pela transferência de um hidreto ( $H^-$ ) para o cofator  $NAD^+$ , formando um tioéster altamente energético. Por fim, ocorre a fosforilação deste último que se dá pelo ataque nucleofílico de um fosfato inorgânico e subsequente liberação do produto (1,3-BPG) pela enzima. [39, 40]

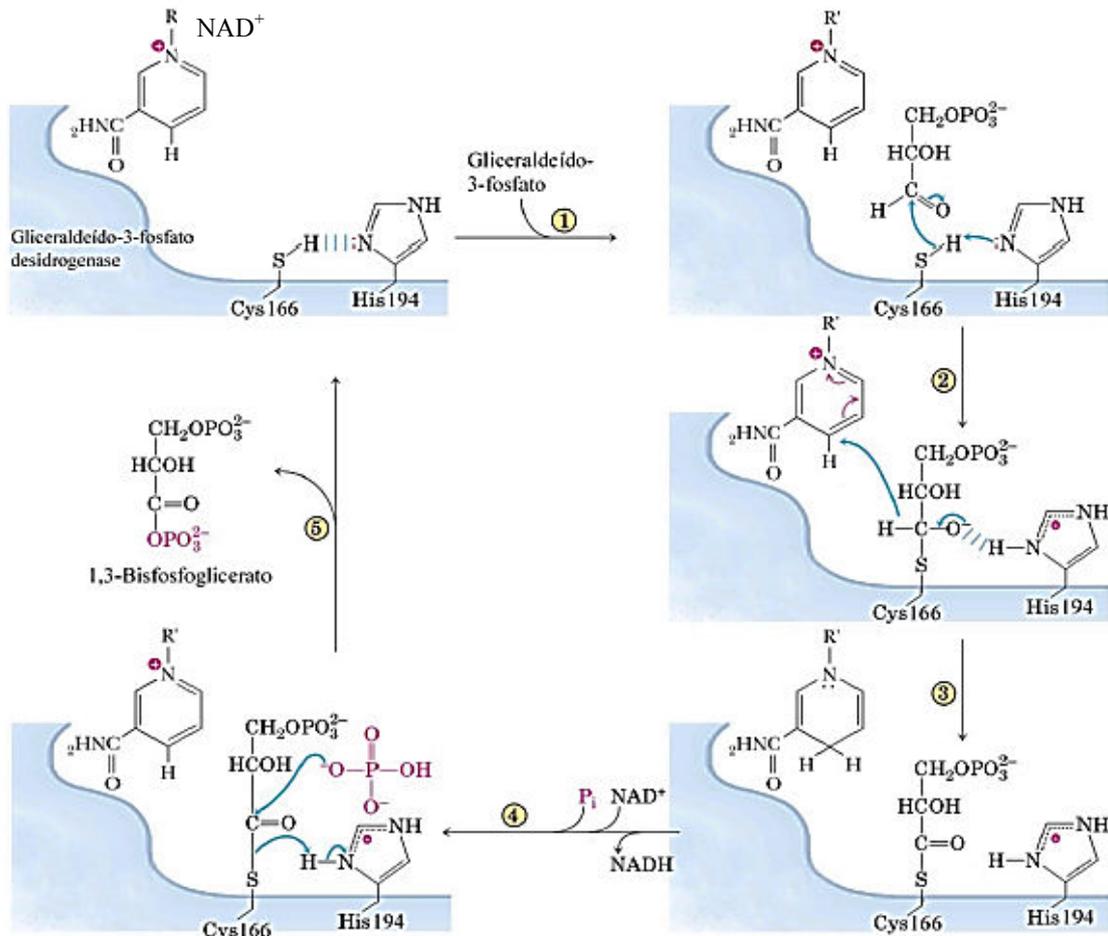


Figura 1.6. Esquemática do mecanismo da reação da enzima GAPDH. (1) Formação do complexo enzima-substrato. (2) Formação do intermediário hemitioacetil, facilitado pela catálise ácido-base promovida pela His194. (3) Formação do intermediário tioéster pela redução do  $NAD^+$  a  $NADH$ . (4) Saída do  $NADH$  e posterior entrada de  $NAD^+$  no sítio ativo da GAPDH e ataque nucleofílico do fosfato inorgânico ao grupo tioéster levando à (5) liberação do produto 1,3-BPG. [41]

Através da estrutura cristalográfica da GAPDH de *Trypanosoma cruzi* (Figura 1.7) que se encontra depositada no Protein Data Bank (PDB), [42] pode-se observar que a estrutura apresenta diferenças estruturais importantes em relação à enzima homóloga de humanos, principalmente no domínio de ligação do  $\text{NAD}^+$  e no sítio catalítico, o que torna o estudo de inibidores desta enzima bastante promissor.

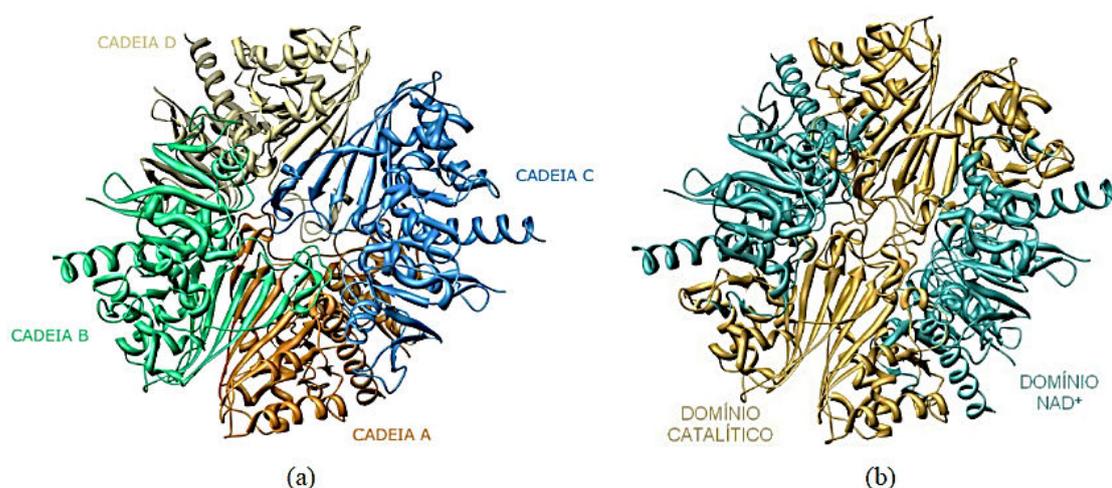


Figura 1.7. Representação em fitas (a) das quatro cadeias da enzima GAPDH e (b) dos domínios  $\text{NAD}^+$  e catalítico. [18]

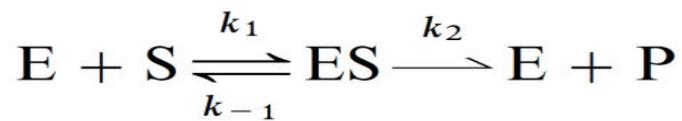
O domínio do  $\text{NAD}^+$  compreende os resíduos 1-150 na extremidade N-terminal e os resíduos 331-359 na extremidade C-terminal. Este domínio contém uma alça formada pelos resíduos 66-76, encontrada somente na família *Trypanosomatidae*. Já o domínio catalítico compreende os resíduos 151-330, incluindo os essenciais para a atividade catalítica, Cys166 e His194. [43]

## 1.5 Cinética Enzimática

No planejamento de fármacos, receptores podem ser proteínas de membrana, receptores hormonais, ácidos desoxirribonucléico (DNA), enzimas, entre outros. [2] Porém as enzimas são um tipo especial de receptor já que catalisam reações químicas. Ao completar a reação catalítica a enzima libera o produto e retorna a forma original. O processo ocorre em duas etapas, na

primeira etapa a enzima (E) se combina com o substrato (S) para formar o complexo ES, com constante de velocidade  $k_1$ , sendo uma etapa reversível. Em seguida o complexo ES tem dois destinos possíveis, ele pode se dissociar a E e S, com uma constante de velocidade  $k_{-1}$  ou pode prosseguir para formar o produto P, com uma constante de velocidade  $k_2$ .

Uma explicação qualitativa da dependência da velocidade de uma reação enzimática com relação à concentração de substrato e sua descrição esquemática, que segue abaixo, foi fornecida por Brown em 1902. [44]



Como a velocidade da reação ( $V$ ) é limitada pela etapa de conversão do complexo [ES] em P, esta dependerá da concentração da enzima que interage com os substratos, e como  $k_2$  é a constante cinética da etapa lenta da reação, [44] tem se que:

$$V = k_2 [\text{ES}] \quad \text{Equação 1}$$

onde  $k_2$  é denominado  $k_{\text{cat}}$  que por sua vez define o número de ciclos catalíticos por unidade de tempo e por quantidade de enzima presente. Quando a enzima encontra-se saturada, sob condições de estado estacionário, a reação atinge a velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ). Essa velocidade é atingida quando praticamente todas as moléculas da enzima estiverem na forma de complexo ES, ou seja,  $[\text{ES}] = [\text{E}]$ . Portanto, a velocidade máxima pode ser descrita quantitativamente como a velocidade da reação enzimática quando a concentração de substrato se aproxima do infinito, assim:

$$V_{\text{máx}} = k_{\text{cat}} [\text{E}] \quad \text{Equação 2}$$

Em solução contendo um excesso de substrato, a reação atinge o estado estacionário e a concentração do complexo [ES] permanecerá

praticamente constante durante o decorrer do tempo. Em um estado estacionário, as concentrações dos intermediários permanecem as mesmas, enquanto as dos materiais iniciantes e dos produtos estão variando. Isso ocorre devido ao fato de as velocidades de formação e de degradação do complexo ES serem iguais. Assim este estado pode ser descrito matematicamente da seguinte forma:

$$k_1 [E][S] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad \text{Equação 3}$$

Dividimos ambos os lados por  $(k_{-1} + k_2)$ :

$$\frac{k_1[E][S]}{(k_{-1} + k_2)} = [ES] \quad \text{Equação 4}$$

A partir da Equação 4 é obtida a constante de Michaelis Mentem ( $K_M$ ), que é a concentração de substrato necessária para que a velocidade da reação enzimática seja igual à metade da velocidade máxima, ou seja, a concentração de substrato necessária para saturar metade dos sítios ativos da enzima presente. Apesar de ser uma constante cinética e não termodinâmica o  $K_M$  pode ser usado como uma forma de mensurar a afinidade da enzima pelo substrato. Quanto menor o valor da constante de Michaelis, maior é a afinidade entre enzima e substrato.

$$\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_M \quad \text{Equação 5}$$

Sendo  $v_{\text{máx}} = k_2 [E_0]$

$$[E_0] = [E] + [ES] \quad \text{Equação 6}$$

Rearranjando as equações 2, 3, 4 e 5 chegamos a Equação de Michaelis-Menten (Equação 7), que é a equação que descreve quantitativamente a cinética enzimática no estado estacionário

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_M [S]} \quad \text{Equação 7}$$

Esta equação nos fornece um gráfico (Figura 1.8) que relaciona a velocidade de uma reação enzimática em função de diferentes concentrações de substrato.

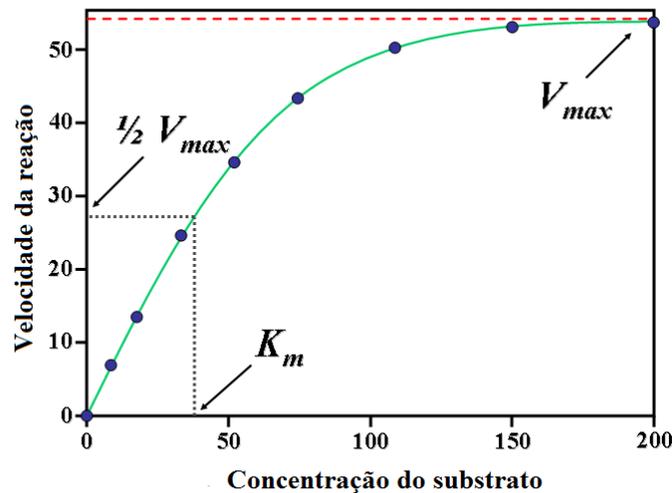


Figura 1.8. Representação de uma curva típica de Michaelis-Menten.

No gráfico acima se observa três regiões distintas, uma no início da curva que apresenta comportamento linear como esperado de uma reação que se processa mostrando comportamento cinético de pseudo-primeira ordem, na qual a concentração do complexo ES é diretamente proporcional à concentração de substrato; uma intermediária que mostra dependência curvilínea de acordo com a concentração de substrato; e uma final na qual a concentração do complexo ES deixa de depender da concentração de substrato, pois praticamente toda a enzima presente faz parte do complexo ES. Assim, a adição de substrato não resulta em aumento da velocidade da reação, o que caracteriza uma reação que apresenta comportamento cinético de ordem zero. [44]

Outro parâmetro cinético importante é a eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ) que é razão entre diferentes constantes cinéticas. Esse parâmetro cinético geralmente é utilizado para comparar a eficiência entre diferentes enzimas ou a eficiência de uma enzima frente a diferentes substratos. Além

disso, quando se comparam diferentes substratos de uma determinada enzima frequentemente são vistas maiores diferenças nos valores de  $k_{\text{cat}}$  invés do valor de  $K_M$ , uma vez que a especificidade entre substratos normalmente resulta de diferenças em seus estados de transição e não da interação dos mesmos com a enzima. Portanto, a razão entre  $k_{\text{cat}}/K_m$  vem sendo considerada como a melhor medida da especificidade de um substrato. [44]

## 1.6 Inibição Enzimática

Muitas doenças são causadas pela deficiência ou pelo excesso de um metabólito específico no organismo, devido à infecção por um organismo estranho ou pelo crescimento de células mutantes. Se os metabólitos forem normalizados, o organismo estranho ou as células mutantes podem ser destruídos e a doença tratada. Esses problemas se resolvem por meio da inibição de uma enzima específica. [45]

Usualmente quando a inibição da enzima ocorre, o substrato é acumulado e os produtos metabólicos deixam de ser gerados ou são em menor quantidade. Se uma célula tem uma deficiência de um substrato para a enzima alvo e essa deficiência resulta em um estado patológico, então a inibição dessa enzima pode impedir a degradação desse substrato aumentando sua concentração.

Inibidor enzimático é uma substância capaz de interagir com uma enzima bloqueando parcialmente ou completamente sua atividade catalítica. A capacidade de uma substância inibir a catálise enzimática depende primeiramente da sua complementaridade em relação aos resíduos do sítio catalítico. [46]

Existem dois tipos de inibição enzimática, a irreversível e a reversível. A inibição enzimática irreversível ocorre quando um inibidor leva à inativação da enzima. Tipicamente isto ocorre devido à formação de uma

ligação covalente entre a enzima e o inibidor, apesar de que alguns inibidores irreversíveis podem interagir com o alvo enzimático de forma tão forte que eles se tornam ligados permanentemente. Na inibição enzimática reversível uma molécula de inibidor se liga de forma reversível à enzima, e com isso apresentando altas velocidades de associação e dissociação. Os inibidores enzimáticos reversíveis podem ser classificados como competitivos, não competitivos e incompetitivos.

### 1.6.1 Inibição competitiva

Inibidor competitivo é uma substância que compete diretamente com o substrato pelo sítio de ligação de uma enzima (Figura 1.9). Em geral, assemelha-se estruturalmente ao substrato ou ao estado de transição da reação. Inibidor competitivo reduz a concentração da enzima livre disponível para a ligação do substrato, já que o inibidor competitivo se liga apenas a enzima livre e não ao complexo enzima-substrato. [44, 47]

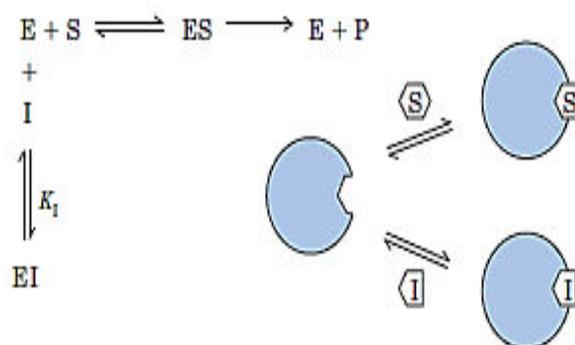


Figura 1.9. Representação esquemática da inibição competitiva. [41]

A competição entre inibidor e substrato pela enzima livre tem o efeito de aumentar a concentração de substrato requerida para que a reação alcance metade da velocidade máxima. Assim, na inibição competitiva observa-

se que a  $V_{m\acute{a}x}$  não é alterada e  $K_M$  é aumentada. A equação de Michaelis-Menten para um inibidor competitivo é

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad \text{Equação 8}$$

### Obtenção do $K_i$

Na inibição enzimática reversível, como há interação entre a enzima e o ligante, entra o conceito da constante de dissociação  $K_d$ , que nesse caso é referido como  $K_i$ . O valor de  $K_i$  pode ser determinado por vários métodos experimentais. A forma mais simples de obtenção do  $K_i$  é através da influência do inibidor na atividade catalítica da enzima.

Além da determinação da constante de inibição associada à uma enzima e um inibidor, uma informação relevante para estudos de inibição enzimática é o mecanismo de inibição. Para tal tem sido descritos vários métodos gráficos que realizam essa tarefa de forma simples. Um deles é o gráfico dos duplo-recíprocos ou de Lineweaver-Burk. Esse gráfico relaciona os valores do inverso da velocidade em função do inverso da concentração de substrato. Quando essas retas são oriundas de ensaios enzimáticos realizados em diferentes concentrações de inibidor e sobrepostas é possível obter como resultado um padrão característico que informa a respeito do mecanismo de inibição. Esse gráfico pode ser obtido a partir do rearranjo da equação 3 resultando em:

$$\frac{1}{V_{max}} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad \text{Equação 9}$$

O gráfico (Figura 1.10) dessa equação é linear, tem uma inclinação de  $\alpha K_M / V_{max}$  uma intersecção no eixo  $1/[S]$  que corresponde a  $-1/K_M$ , e uma

intersecção no eixo  $1/v_0$  que tem como valor  $1/V_{max}$ . O gráfico de duplo-recíprocos para um inibidor competitivo em várias concentrações de inibidor tem intersecção em um mesmo valor de  $1/V_{max}$  no eixo  $1/v_0$ , uma propriedade da inibição competitiva.

A partir da determinação de valores de  $\alpha$  em diferentes concentrações de inibidor para uma enzima de  $K_M$  conhecido, o valor de  $K_i$  pode ser calculado pela equação 9. A comparação dos valores de  $K_i$  de inibidores competitivos com diferentes estruturas pode fornecer informações sobre as propriedades de ligação do sítio ativo de uma enzima e, conseqüentemente, seu mecanismo catalítico.

Os estudos de inibição competitiva são também utilizados para determinar a afinidade de análogos do estado de transição pelo sítio ativo de uma enzima.

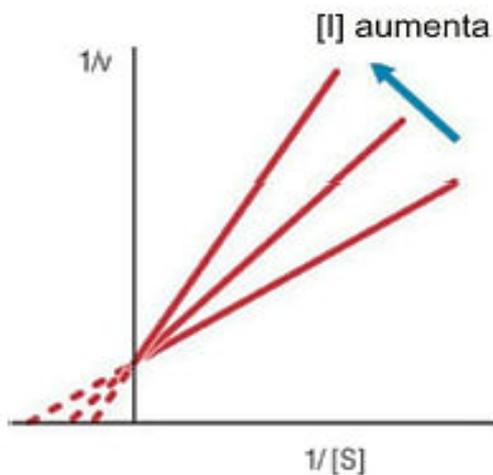


Figura 1.10. Gráfico de Lineweaver-Burk de uma inibição competitiva. A intersecção com o eixo Y é constante e igual a  $1/V_{max}$ , mas a inclinação das retas ( $K_M/V_{max}$ ) e a intersecção com o eixo X (correspondente a  $-1/K_M$ ) se alteram com o aumento da [I]. [48]

## 1.6.2 Inibição Não-competitiva

Na inibição não-competitiva, o inibidor não ocupa o sítio ativo da enzima, interagindo com outro sítio e assim não competindo com o substrato

pelo sítio de ligação (Figura 1.11). Assim, inibidores não-competitivos possuem afinidade tanto pela enzima livre quanto pelo complexo ES. [44]

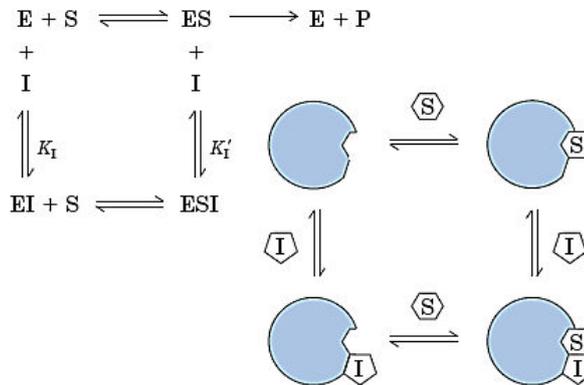


Figura 1.11. Representação esquemática da inibição não-competitiva. [41]

Na inibição não-competitiva o valor de  $V_{max}$  é diminuído e o valor de  $K_M$  não é alterado. A equação de Michaelis-Menten para um inibidor não-competitivo é

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \qquad \text{Equação 10}$$

O gráfico dos duplo-recíprocos (Figura 1.12) para inibição não-competitiva consiste de retas com uma inclinação igual a  $K_M/V_{max}$  com intersecção no eixo  $1/[S]$ . Ao contrário da inibição competitiva, a inibição não competitiva não pode ser suplantada pelo aumento da concentração de substrato  $1/v_0$  de  $1/V_{max}$  e intersecção no eixo  $1/[S]$  de  $-1/K_M$ . As retas obtidas de ensaios com diferentes valores de  $[I]$  cruzam-se à esquerda do eixo  $1/v_0$ .

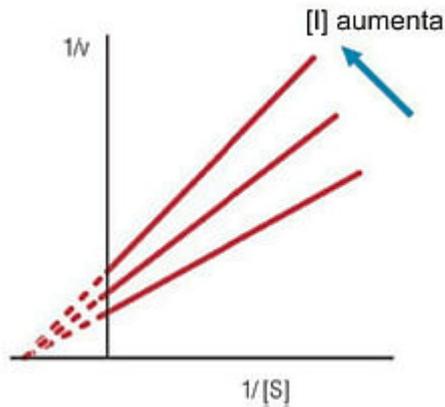


Figura 1.12. Gráfico Lineweaver-Burk de uma inibição não-competitiva. Tanto a intersecção com o eixo Y quanto a inclinação das retas ( $K_M/V_{max}$ ) variam de acordo com a [I]. Todas as retas interceptam o eixo X (correspondente a  $-1/K_M$ ) no mesmo ponto independente da [I]. [48]

### 1.6.3 Inibição Incompetitiva

Na inibição incompetitiva, o inibidor se liga exclusivamente ao complexo ES com baixa ou nenhuma afinidade pela enzima livre, como mostrado na Figura 1.13. Neste tipo de inibição é necessário que primeiramente se forme o complexo enzima-substrato, para que só então o inibidor possa se ligar ao complexo e assim inibir a reação enzimática. [44]

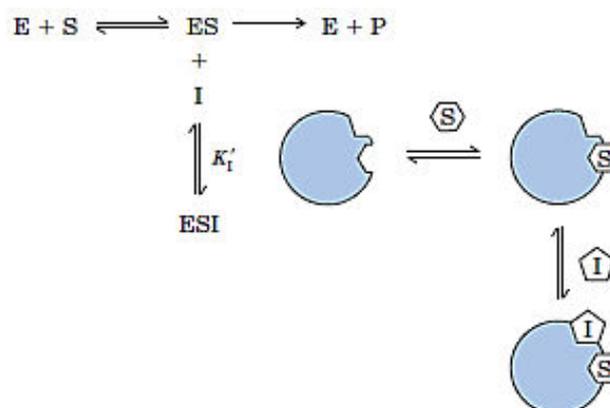


Figura 1.13. Representação esquemática da inibição incompetitiva. [41]

Na inibição incompetitiva há o decréscimo dos valores de  $V_{max}$  e de  $K_M$ . A equação de Michaelis-Menten para um inibidor incompetitivo é alterada por um fator de  $\alpha$ .

$$v = \frac{V_{max} [S]}{[S] \left( 1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right) + K_M} \quad \text{Equação 11}$$

O gráfico de duplos recíprocos (Figura 1.14) consiste em um conjunto de retas paralelas com inclinação  $K_M/V_{max}$ . Essas retas interceptam o eixo  $1/v_0$  e intersecção em  $1/[S]$  igual a  $-1/K_M$ . A inclinação das retas não depende da concentração do inibidor e proporciona a determinação de  $K_M/V_{max}$ , que por sua vez são afetados igualmente na presença do inibidor.

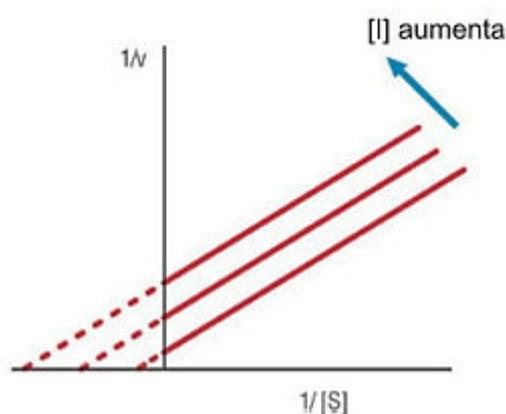


Figura 1.14. Gráfico Lineweaver-Burk de uma inibição incompetitiva. A diminuição do valor de  $V_{max}$  é refletida através de diferentes intersecções no eixo Y para concentrações crescentes de inibidor. A intersecção com o eixo X também varia com a  $[I]$ , fornecendo diferentes valores do termo  $-1/K_M$  evidenciando que o valor de  $K_M$  também diminui para esse tipo de inibição. [48]

## 1.7 Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

Todos os fenômenos biológicos, virtualmente, dependem do reconhecimento molecular, sendo intramolecular quando um ligante interage com uma macromolécula. A descrição das forças que regem a formação de complexos bimoleculares tem enorme importância na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Diferentes métodos podem ser utilizados para descrição das interações complementares com orientação dos grupos que

estão interagindo. Várias técnicas experimentais podem ser usadas para estudar os processos de interação ligante-receptor, como por exemplo, a calorimetria.

A calorimetria de titulação isotérmica (ITC) mede a troca de calor observada durante uma reação e vem sendo utilizada atualmente para determinar parâmetros termodinâmicos e cinéticos. [49]

A ITC é utilizada principalmente no estudo de interações não-covalentes entre cadeias poliméricas, equilíbrios de dissociação de aminoácidos em diferentes estados de protonação, estudos termodinâmicos de detergentes e a formação de micelas, interações entre macromoléculas e ligantes e estudos cinético enzimáticos. [50]

### **1.7.1 Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Interação Enzima-Inibidor através de ITC**

A maioria dos calorímetros de titulação isotérmica são baseados em celas com sistema de retorno e mede os efeitos diferenciais do calor entre a cela de referência (preenchida com tampão ou água) e a cela de amostra (ou cela de reação) e trabalha com base no sistema de compensação de calor. [51] É feito o monitoramento constante da temperatura entre as duas celas e uma energia constante (definida pelo usuário) é aplicada na cela de referência, a qual ativa o circuito de retorno para aplicar uma quantidade de energia variável sobre a cela de amostra para manter uma diferença de temperatura entre as duas celas próxima de zero (Figura 1.15). [52]

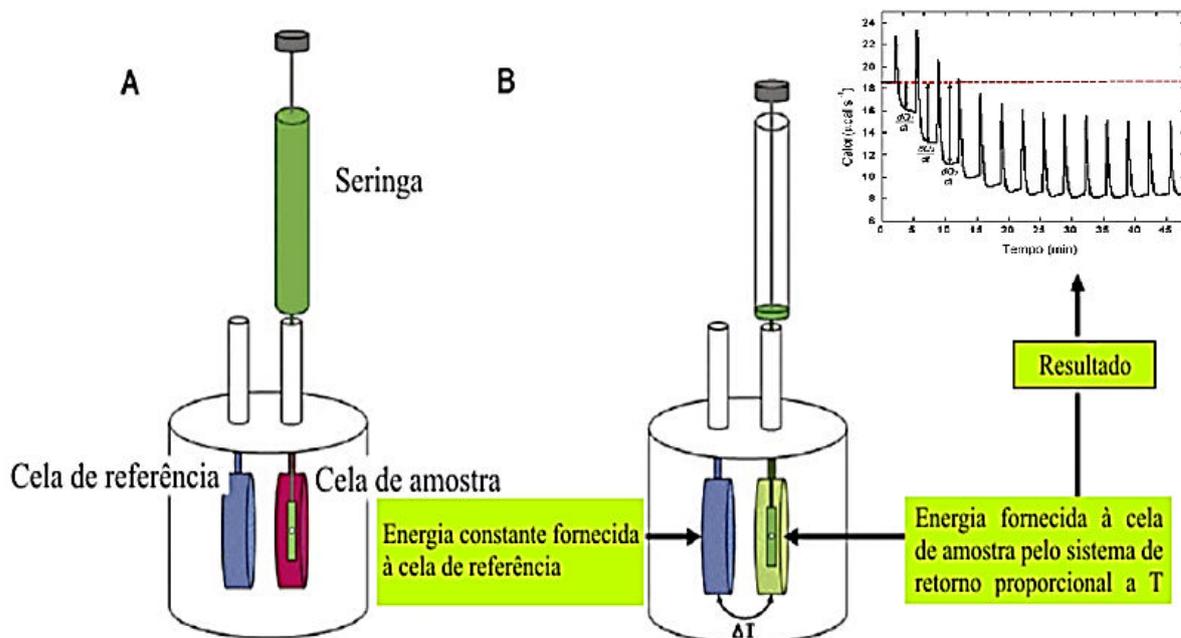


Figura 1.15. Representação de um calorímetro de Titulação Isotérmica: (a) celas de referência e amostra que são mantidas na mesma temperatura no início do experimento. (b) Ao se iniciar a titulação ocorre variação na temperatura da cela de amostra, levando a uma variação da energia fornecida a esta cela, mantendo assim a diferença de temperatura entre as celas iguais a zero. Figura adaptada. [53]

Quando ocorre uma reação, a temperatura na cela de amostra é alterada, levando a uma diferença de calor entre as duas celas. O calorímetro detecta essa diferença e aplica uma energia na cela de amostra, ajustando a temperatura e mantendo a diferença de calor entre as celas igual a zero. O sinal observado num experimento calorímetro é a energia fornecida à cela de amostra.

Através da ITC é possível acompanhar a velocidade de reação em sistemas enzimáticos, uma vez que a energia produzida pela reação é proporcional ao calor liberado pela mesma. Foi demonstrado por Todd e Gomez [52] que a quantidade de energia ou potência térmica ( $E$ ) produzida pela reação é proporcional ao calor ( $Q$ ) trocado pelo sistema, seja exotérmico ou endotérmico.

$$E = \frac{dQ}{dt} \quad \text{Equação 12}$$

Uma reação química termodinamicamente favorável é espontânea desde que se tenha uma diminuição da energia livre, que é a soma dos termos entálpico e entrópico ( $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ). Em condições de pressão constante, o componente entálpico é observado como *calor*. A quantidade de calor associado na conversão de  $n$  moles de substrato em produto é dada por

$$Q = n\Delta H_{app} = [P]_{total}V\Delta H_{app} \quad \text{Equação 13}$$

em que  $V$  é o volume de solução na cela de amostra,  $\Delta H_{app}$  é a entalpia molar aparente e  $[P]$  a concentração molar do produto. Uma vez que a potência térmica é proporcional à taxa de produto gerado pela reação, tem-se:

$$E = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt}V\Delta H_{app} \quad \text{Equação 14}$$

Rearranjando a Equação 14, onde  $d[P]/dt$  é igual à velocidade de formação do produto ou consumo do substrato:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V_0\Delta H_{app}} \frac{dQ}{dt} \quad \text{Equação 15}$$

onde  $dQ/dT$  é o fluxo de calor determinado,  $v$  é a velocidade da reação,  $V_0$  é o volume da cela e  $\Delta H_{app}$  é a entalpia aparente da reação determinada experimentalmente.

Sistemas enzimáticos que necessitam mais de um substrato, deve ser realizada sob as condições de pseudo-primeira ordem com relação a um dos substratos. Uma curva típica da velocidade de reação através do uso da calorimetria de titulação isotérmica é demonstrada na Figura 1.16. Observa-se um pico inicial logo após a injeção do substrato, neste caso endotérmico, e que corresponde ao calor de diluição. A linha base se estabiliza numa potência

térmica menor que a observada antes da injeção (linha pontilhada). Isso se deve ao fato de certa quantidade de calor ser gerada pela reação enzimática e assim a energia necessária para manter o equilíbrio entre as duas celas é menor. A cada injeção a linha base se estabiliza e um nível inferior. A quantidade de calor gerada para cada concentração de substrato é proporcional a velocidade de reação. [51]

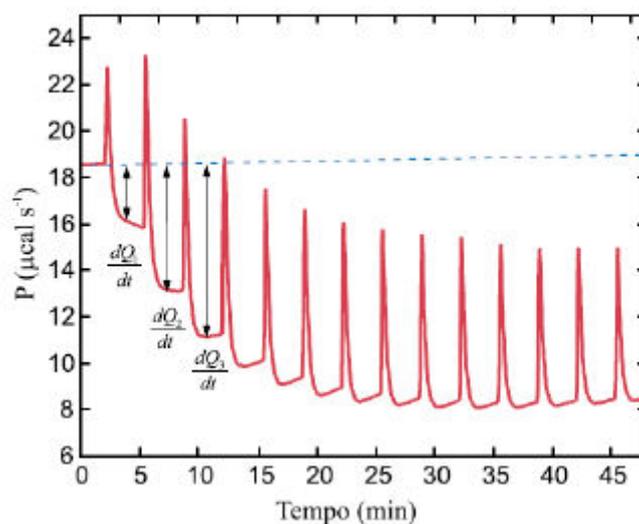


Figura 1.16. Representação gráfica de uma curva típica da velocidade de uma reação obtida no ITC: potência térmica *versus* o tempo. [51]

Os dados obtidos são ajustados graficamente a equação de Michaelis-Menten através de uma regressão não linear. E então os parâmetros cinéticos  $k_{cat}$  e  $K_M$  são determinados. A constante de inibição ( $K_i$ ) também pode ser obtida através de experimentos calorimétricos. [54] É realizado um experimento controle e determinadas às constantes de Michaelis-Menten, em seguida realizado um experimento na presença do inibidor e os dados obtidos são ajustados graficamente na equação correspondente ao tipo de inibição, sendo assim, determinada a constante de inibição ( $K_i$ ).

## **1.8 Estudo Celular utilizando como organismo modelo a levedura *Saccharomyces cerevisiae***

Muitos fármacos utilizados na terapêutica foram descobertos durante ensaios experimentais e mediante observações em seres vivos. Os avanços no desenvolvimento de medicamentos baseiam-se em determinar as alterações, tanto bioquímicas como celulares, que causam doenças, e no estudo de compostos que possam prevenir ou corrigir essas anormalidades de modo específico. [55]

Os ensaios bioquímicos e celulares são geralmente usados no início do processo de descoberta de moléculas bioativas, enquanto que estudos mais complexos em órgãos e em animais são usados na fase de otimização a fim de se caracterizar as propriedades farmacológicas da molécula. [55]

A atividade de uma pequena molécula em um ensaio bioquímico nem sempre se traduz na mesma atividade num contexto celular, devido a certas características como a permeabilidade da membrana e citotoxicidade. [56] As células se constituem como a menor unidade vital no organismo em estudo, portanto esta apresenta características mais próximas do ser vivo. Esse sistema, no entanto, possui uma complexidade muito maior que em estudos enzimáticos que utilizam apenas uma macromolécula isolada. Dessa forma, torna-se mais difícil estabelecer o mecanismo de ação de uma nova molécula em ensaios celulares, quando comparado com o estudo enzimático. Portanto, observa-se que os ensaios celulares e bioquímicos são complementares e devem ser aplicados nas etapas iniciais de caracterização da atividade farmacológica da molécula em estudo.

Os ensaios baseados em células muitas vezes não tem a priori nenhum conhecimento de um alvo molecular específico. Em vez disso, eles visam identificar moduladores de uma rota bioquímica na célula. Nesses ensaios, diversas macromoléculas podem ser investigadas, dando oportunidade

para múltiplos potenciais pontos de intervenção, em oposição a uma única possibilidade predefinida como na abordagem bioquímica. O estudo baseado em células permite a seleção de compostos que são capazes de atravessar a membrana celular e também pode fornecer indícios de citotoxicidade aguda, que servirá como um alerta para os estudos posteriores destes compostos. [56]

### **1.8.1 *Saccharomyces cerevisiae***

A célula é a unidade estrutural e funcional básica de todos os organismos vivos. É a menor entidade que exhibe todas as características da vida. Organismos unicelulares que crescem rapidamente podem ser usados como modelos que mimetizam algumas propriedades das células de mamíferos. O *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura, é um organismo unicelular com tais características, pois sua GAPDH possui elevada identidade (aproximadamente 63% de identidade na sequência primária de aminoácidos) com a de humanos. [57] Assim o *S. cerevisiae* se mostra como um excelente ponto de partida para a análise de organismos eucariontes mais complexos.

O *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura que se multiplica a partir de brotamento e é bastante utilizada desde os tempos antigos, em panificação e cervejaria. [58] É um dos organismos eucariotos mais estudados como modelo em biologia molecular e celular. Possui formato arredondado e 10-50 micrômetros de diâmetro. [59]

As leveduras possuem duas formas de crescimento e sobrevivência: haplóides e diplóides. O ciclo de vida haplóide consiste em mitose, o crescimento, e finalmente a morte, esta última mais rápida em condições extremamente estressantes. Já as células diplóides, apresentam uma maior facilidade de replicação e isolamento, possuem um sistema genético bem definido, e um sistema de transformação de DNA altamente versátil. Sendo elas não patogênicas, permite uma fácil manipulação, com baixo risco para o (a)

pesquisador (a). [60] Devido à sua rápida multiplicação e facilidade de trabalho, o *S. cerevisiae* é comumente usada em triagens de moléculas bioativas.

## 1.8.2 Ensaio Celular por Fluorimetria

O mecanismo fundamental de fluorescência é a emissão de fótons quando a molécula excitada no estado singleto retorna ao estado fundamental. O processo de emissão e excitação no fenômeno de fluorescência é muito rápido com tempo de vida na ordem de nano segundo. Desta forma, é possível observar facilmente fluorescência à temperatura ambiente e diretamente em solução.[61] Como a detecção do sinal analítico é dependente da quantificação da emissão de um fóton excitado, as maiores limitações do método advêm da alteração desta como, por exemplo, da presença de moléculas que irão atuar como desativadoras (“quencher”), quando ocorre decomposição do fluoróforo excitado (“photobleaching”), ou então quando a amostra possui interferentes (ou outros fluoróforos) que emitem no mesmo comprimento de onda. [62]

Uma variedade de métodos de detecção pode ser utilizada em ensaios celulares. Entre os quais para se ter medidas uniformes destacam-se fluorescência, quimioluminescência e espectrofotometria (colorimetria, ultravioleta, infravermelho). A detecção por fluorescência por meio de um fluorímetro é sem dúvida a abordagem mais amplamente utilizada devido a vários aspectos: alta sensibilidade, existência de diversos fluoróforos disponíveis, facilidade de operação e vários modos de leitura. Como resultado, a fluorescência tem sido aplicada para monitorar uma ampla gama de ensaios biológicos, tais como pesquisa de dinâmica e interações moleculares, atividades enzimáticas, transdução de sinal, a vitalidade das células e distribuição de moléculas, organelas ou células, etc. [56]

Os ensaios de fluorescência geralmente são divididos em duas classes. A primeira classe engloba técnicas que macroscopicamente detectam a

intensidade total de fluorescência, como fluorescência polarizada, transferência ressonante de energia de fluorescência (FRET), fluorescência resolvida no tempo, e combinação destas técnicas, como a polarização de fluorescência resolvida no tempo. A segunda classe de ensaios baseados em fluorescência detecta fluorescência a partir de simples moléculas fluorescentes, tais como a espectroscopia de correlação de fluorescência e a análise da distribuição da intensidade de fluorescência. [56]

### **1.8.2.1 Ensaio celular utilizando o FUN-1**

Muitas técnicas de fluorescência são empregadas para avaliar a viabilidade e atividade de células microbianas utilizadas nos estudos celulares para a descoberta de moléculas bioativas e em biotecnologia. [63]

O tipo de célula em estudo é um dos parâmetros que deve ser analisado para escolher o tipo de fluoróforo e qual método deverá ser aplicado. Conforme dito anteriormente, a viabilidade celular é um parâmetro importante para detectar a resposta biológica e, neste caso, pode estar associada a atividade tóxica. O *S. cerevisiae* é uma levedura que possui a enzima GAPDH com elevada identidade a do ser humano e, assim, foi usada como modelo. Caso as moléculas inibam a GAPDH do parasito *T. cruzi* (e levem a sua morte) em uma concentração similar na levedura, teremos um indicativo da elevada citotoxicidade destas.

O ensaio fluorimétrico utilizando o FUN-1, obtido da empresa Invitrogen pode ser realizado para determinar a presença de células de leveduras vivas e mortas de amostras em vários fluidos biológicos. [64]

O FUN-1 [iodeto-2-cloro-4-(2,3-diidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metilideno)-1-fenilquinolina] [65] é um corante fluorescente que pode ser utilizado em estudos de leveduras e outros fungos a fim de se monitorar a viabilidade celular e também ensaio de infecção fúngica no contexto clínico.[66,

67] Este fluoróforo apresenta o seguinte mecanismo: quando a membrana plasmática está intacta a levedura internaliza o FUN-1, então o corante é visto como uma fluorescência citosólica verde difusa. O FUN-1 é então transportado para o vacúolo metabolicamente ativos em células do tipo selvagem e, posteriormente é compactado em estruturas cilíndricas intravacuolares (CIVS) vermelho fluorescente por uma via de transporte ainda desconhecida, como pode ser visto na Figura 1.17. [68]

Este corante é usado para determinar a viabilidade de leveduras, já que apenas células vivas formam CIVS. Células mortas não são capazes de transportar o corante para o vacúolo e, portanto não formam CIVS permanecendo o corante citosólico verde fluorescente. [69, 70]

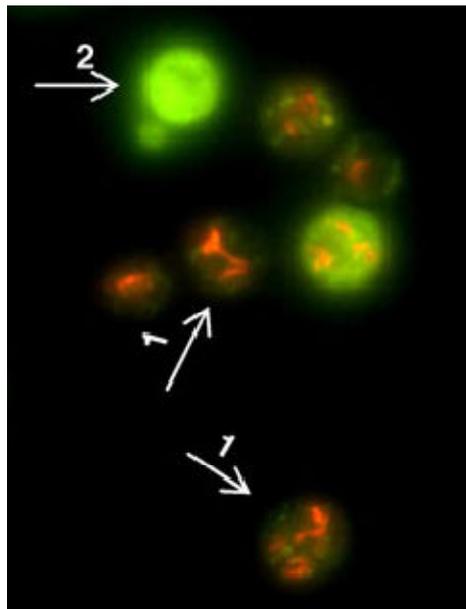


Figura 1.17. Micrografia das células de *S. cerevisiae* depois de serem expostas ao corante. Setas 1: células metabolicamente ativas; Seta 2: células metabolicamente inativa. [70]

Deve-se salientar que esse tipo de ensaio não é capaz de identificar o mecanismo de morte celular. Portanto, esses estudos podem ser complementados com ensaios bioquímicos para a enzima isolada.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Identificar inibidores da GAPDH de *T. cruzi* seletivos a GAPDH de humanos, e utilizar o *S. cerevisiae* como sistema modelo para a integração dos ensaios enzimáticos aos celulares.

### **2.2 Objetivos específicos**

- (i) Determinar a atividade/seletividade de compostos frente à TcGAPDH e HsGAPDH no sítio do NAD<sup>+</sup> utilizando a ITC.
- (ii) Ensaios celulares por fluorimetria usando *S. cerevisiae* como modelo de ação biológica.

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Ensaio cinéticos**

Os reagentes D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P), tampão HEPES, ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA),  $\beta$ -mercaptoetanol, arseniato de sódio ( $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) e o dimetilsulfóxido (DMSO), fosfatos de sódio monobásico e dibásico e enzima GAPDH de humanos, foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

A enzima GAPDH de *T. cruzi* foi obtida através de ensaio de expressão e purificação por protocolo desenvolvido no grupo NEQUIMED - PN em trabalhos anteriores. [71]

Os compostos Nequimed135, Nequimed136, Nequimed137, Nequimed138, Nequimed139, Nequimed140, Nequimed141 e Nequimed142, foram sintetizados pelo Laboratório de Nucleosídeos, Heterociclos e Carboidratos – LNHC da Universidade Federal Fluminense (UFF), coordenado pela Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Cecília Bastos Vieira de Souza.

#### **3.1.2 Ensaio Celulares**

Os reagentes dimetilsulfóxido (DMSO), tampão HEPES, acetato de sódio, a glicose, foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. O meio de cultura Luria Broth (LB) foi adquirido da empresa Fermentas.

O composto FUN-1(R) foi adquirido da empresa Invitrogen.

O inóculo contendo *S. cerevisiae* em ágar Sabouraud foi adquirido da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI).

### 3.2 Procedimento Experimental

Os experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foram realizados num calorímetro VP-ITC da Microcal (Northampton, MA). Previamente ao início dos experimentos, a seringa e a cela de amostra foram lavadas com 500 mL de uma solução de água e detergente e depois mais 500 mL de água ultrapura (Mili-Q).

A cela de referência foi preenchida com água Mili-Q previamente degaseificada durante 5 minutos sob agitação constante no ThermoVac, que é uma bomba de vácuo com controle de temperatura. Todas as soluções usadas na cela de amostra e na seringa também foram degaseificadas e simultaneamente termostalizadas por 5 minutos a fim de se eliminar bolhas de ar, as quais provocam ruídos no sinal obtido pelo aparelho. As soluções foram termostalizadas em uma temperatura menor que a temperatura experimental (entre 0,5 e 2 °C) para evitar um longo período de estabilização térmica entre as celas de amostra e referência do calorímetro.

As celas de referência e amostra foram preenchidas com o auxílio de uma seringa de 2,5 mL do tipo “*gaslight*” (Hamilton). A solução foi lentamente injetada para evitar a formação de bolhas. Ao fim da injeção, foram realizados movimentos em círculo e verticais com a seringa para retirar bolhas pudessem ter sido formadas. Foi preparado 2 mL de solução para preenchimento da cela de amostra, que apresenta um volume de 1,427 mL, sendo que o excesso retirado após o preenchimento da cela. A seringa que apresenta um volume de 284,21  $\mu\text{L}$  foi preenchida lentamente e em seguida purgada duas vezes, eliminando bolhas.

Ao início de cada experimento, é necessário um tempo por volta de 5 minutos para estabilização da temperatura. Em seguida, começa a estabilização da linha base que dura em torno de 15 minutos. Foi estabelecido um tempo adicional de 60 s, após a equilibração preliminar, para se gerar a linha

base usada na análise. A velocidade dos experimentos foi de 307 rpm e a temperatura de 25 °C.[72] A potência térmica ( $\mu\text{cal s}^{-1}$ ) foi registrada como uma função do tempo. Os dados foram coletados pelo *Software VPViewer* a cada 2 segundos.

Os experimentos fluorimétricos foram conduzidos com um fluorímetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader da empresa BioTec Instruments, Inc. Os dados obtidos foram coletados pelo Gen5<sup>TM</sup> Software.

### **3.2.1 Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima *TcGAPDH***

Os parâmetros cinéticos da enzima *TcGAPDH* para o sítio do  $\text{NAD}^+$  foram determinados de acordo com protocolo já estabelecido no grupo NEQUIMED- PN. [18] A seringa foi preenchida com  $\text{NAD}^+$  5 mM no tampão HEPES (100 mM pH 8,0) e 5% de DMSO. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão,  $\text{NaHAsO}_4$  30 mM, D,L-G3P 1mM, 5% de DMSO e a enzima *TcGAPDH* 5 nM. O substrato foi titulado sobre a enzima através de 25 injeções consecutivas de 2  $\mu\text{L}$ , com intervalo entre elas de 90 segundos.

Os parâmetros cinéticos em relação ao substrato G3P também foram determinados. Nesse caso a seringa foi preenchida com D,L-G3P 5 mM no tampão HEPES 100 mM pH 8,0 e 5% de DMSO. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão,  $\text{NaHAsO}_4$  30 mM,  $\text{NAD}^+$  1,5 mM, 5% de DMSO e a enzima *TcGAPDH* 5 nM. O substrato foi titulado sobre a enzima através de 25 injeções consecutivas de 4  $\mu\text{L}$ , com intervalo entre elas de 120 segundos.

### 3.2.2 Ensaios de inibição

Foram realizados os ensaios de inibição preenchendo-se a cela de amostra com o tampão HEPES 100 mM pH 8.0, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, D,L-G3P 1mM, 5% de DMSO e a enzima *Tc*GAPDH 5 nM.

Antes de cada ensaio de inibição foi realizado um experimento controle. Em seguida, o ensaio de inibição foi realizado sob as mesmas condições do controle, o composto a ser testado foi adicionado conjuntamente na cela de amostra contra a enzima em uma concentração de 50 µM. A seringa foi preenchida com solução contendo NAD<sup>+</sup> 5,0 mM, no mesmo tampão da cela de amostra e 5% de DMSO. Titulou-se o NAD<sup>+</sup> na solução contendo a enzima através de 25 injeções com intervalos entre elas de 90 segundos.

### 3.2.3 Ensaio de seletividade dos compostos frente à *Hs*GAPDH

Um ponto de fundamental importância no estudo de inibidores de enzimas essenciais para agentes causadores de doenças é a sua seletividade. Dessa forma os compostos foram testados contra a enzima GAPDH de humanos, uma vez que o objetivo é que estas inibam a enzima GAPDH presente no parasito, porém que não sejam inibidores da enzima GAPDH de humanos.

Primeiramente os parâmetros cinéticos da enzima *Hs*GAPDH foram determinados. A seringa foi preenchida com NAD<sup>+</sup> 5 mM no tampão HEPES (250 mM pH 8,0) e 5% de DMSO. A cela de amostra foi preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO<sub>4</sub> 30 mM, D,L-G3P 1mM, 5% de DMSO e a enzima *Hs*GAPDH 0,5 nM. O substrato foi titulado sobre a enzima através de 25 injeções consecutivas de 2 µL, com intervalo de 90 segundos entre elas.

A avaliação dos compostos frente à enzima *Hs*GAPDH a fim de se testar a sua seletividade, foi realizada preenchendo-se a seringa com NAD<sup>+</sup> 5mM no tampão HEPES (250 mM; pH 8,0) e 5% de DMSO. A cela foi

preenchida com o mesmo tampão, NaHAsO<sub>4</sub> 30mM, G3P 1 mM, a enzima HsGAPDH 0,5 nM e os compostos diluídos em DMSO numa concentração de 50 µM. Titulou-se a enzima através de 25 injeções de 3 µL, com intervalos entre elas de 90 segundos. Foi realizado um experimento controle na ausência de inibidor antes de cada ensaio de inibição seguindo o mesmo protocolo já descrito.

### **3.2.4 Análise dos dados**

Todos os experimentos nesse trabalho foram realizados ao menos em duplicata. Os dados referentes à concentração do substrato [S], e a velocidade da reação, ( $v$ ), foram obtidos usando o programa Origin 7.0 [73] no modo “*Ensaio Enzimático*” desse programa de acordo com o “método 2: somente substrato”. Esse método é usado quando o experimento é realizado através de múltiplas injeções. Os dados obtidos foram exportados do programa *Origin 7.0* para o programa *SigmaPlot 10.0.1* e as constantes cinéticas determinadas a partir do ajuste não-linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten.

### **3.2.5 Ensaio Celular**

#### **3.2.5.1 Preparação do Meio**

Para o crescimento das células foi necessária a preparação do meio de cultura Luria Broth suplementado com 2% de glicose, além de um tampão. Inicialmente, diferentes condições tamponantes (pH entre 4,0 e 7,0) foram testadas para o meio, sendo que houve uma variação no seu pH 6,0 e 7,0. A concentração do tampão também foi otimizada para que houvesse a manutenção de seu efeito ao longo de todo o experimento. A melhor condição foi obtida para o tampão acetato 10 mM em pH 5,0. Esta solução foi filtrada e em seguida

autoclavada nas condições específicas para esterilização, com a pressão de 1 atm durante 20 minutos.

### **3.2.5.2 Crescimento das Células**

As células foram reconstituídas a partir de uma alíquota armazenada a  $-86^{\circ}\text{C}$ , usando 25 mL do meio de cultura. Essa solução foi mantida sob agitação (220 rpm) a  $37^{\circ}\text{C}$ , conforme observado anteriormente.[74] Houve o acompanhamento do crescimento das células a cada 2 horas até que fosse atingido o patamar de estabilização da cultura que ocorreu por volta de 60 h. Este acompanhamento se deu pela leitura de sua absorbância a 700 nm, além da contagem de células com o auxílio da câmara de Neubauer.

### **3.2.5.3 Determinação da concentração do FUN-1**

Para o ensaio dos compostos através da espectroscopia de fluorescência foi necessária a determinação da concentração de FUN-1 a ser utilizada, de acordo com o protocolo estabelecido pela Invitrogen/Molecular probes [64] a seguir:

1. Preparou-se o tampão que iria ser utilizado nos ensaios: Na-HEPES pH 7,2, contendo 2% de Glicose (solução GH).
2. Centrifugou-se aproximadamente  $10^7$  células/mL<sup>-1</sup> de células por 5 minutos a 10000 rpm Em seguida as células foram ressuspensas com a solução estéril GH, produzindo uma concentração com  $1 \times 10^7$  células/mL<sup>-1</sup>.

Adicionou-se 200 mL de água para todos os poços das linhas A e H, e colunas 1 e 12 para evitar uma excessiva evaporação de líquido dos poços mais próximos das bordas. Foi pipetado 100  $\mu\text{L}$  da solução contendo as células nas linhas B a D, nas colunas 2 a 11. Nas linhas E a G e colunas 2 a 11 foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do tampão Na-HEPES. Por fim nas linhas B a G e colunas 2

a 11 o FUN-1 foi adicionado num esquema de diluição seriada de acordo com as seguintes concentrações: 60, 30, 20, 10, 5 e 2,5  $\mu\text{M}$ . As linhas 8-11 foram utilizadas como branco.

O ensaio foi realizado numa placa de 96 poços (Figura 3.1), onde a reação do FUN-1 com a célula foi acompanhada por fluorescência com a excitação em 485 nm e emissão 530 nm e 620 nm. O experimento foi acompanhado durante 2 horas, com intervalo de 10 minutos entre cada leitura, mantendo-se temperatura a 37°C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
FUN-1 ( $\mu\text{M}$ )		60	30	20	10	5	2,5					

Figura 3.1. Representação da placa de 96 poços para ensaio de determinação da concentração de FUN-1. Região em verde = água; Região em vermelho = célula + FUN-1; Região em amarelo: tampão + FUN-1, Região em azul: célula e tampão (corresponde ao branco).

### 3.2.5.4 Ensaio dos inibidores da GAPDH na *Saccharomyces cerevisiae*

Após a determinação da concentração do FUN-1 e porcentagem de DMSO, realizou-se o ensaio dos compostos contra a levedura. O composto foi preparado numa solução de tampão Na-HEPES e DMSO, conforme as condições anteriormente obtidas. Pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução contendo as células nas linhas B a D, nas colunas 3 a 11. Nas linhas E a G e colunas 3 a 11 foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do tampão Na-HEPES. Os compostos foram adicionados nas linhas B a G e colunas 3 a 9 com uma concentração de 500  $\mu\text{M}$ . A coluna 10

foi utilizada como branco da célula e FUN-1, enquanto que a coluna 11 foi utilizada como branco da célula, FUN-1 e DMSO. O restante da placa foi preenchido com 200  $\mu\text{L}$  de água.

### **3.2.5.5 Ensaio de dose-resposta do composto com atividade contra a *Saccharomyces cerevisiae***

Foi realizado o estudo do composto ativo (Nequimed137) contra a *S. cerevisiae*, obtido a partir de triagem inicial especificada no subitem anterior. Pipetou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução contendo as células nas linhas B a D, nas colunas 3 a 10. Nas linhas E a G e colunas 3 a 10 foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  do tampão Na-HEPES. O composto foi adicionado nas linhas B a D, nas colunas 3 a 9 num esquema de diluição seriada de acordo com as seguintes concentrações: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81  $\mu\text{M}$ . O restante da placa foi preenchida com água.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima *TcGAPDH*

Foram realizados estudos cinéticos da enzima *TcGAPDH* em função do  $\text{NAD}^+$ . Os resultados experimentais obtidos foram ajustados graficamente sendo a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros cinéticos  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  obtidos por ajuste não-linear. Na figura 4.1 é demonstrado o ensaio calorimétrico da enzima *TcGAPDH*.

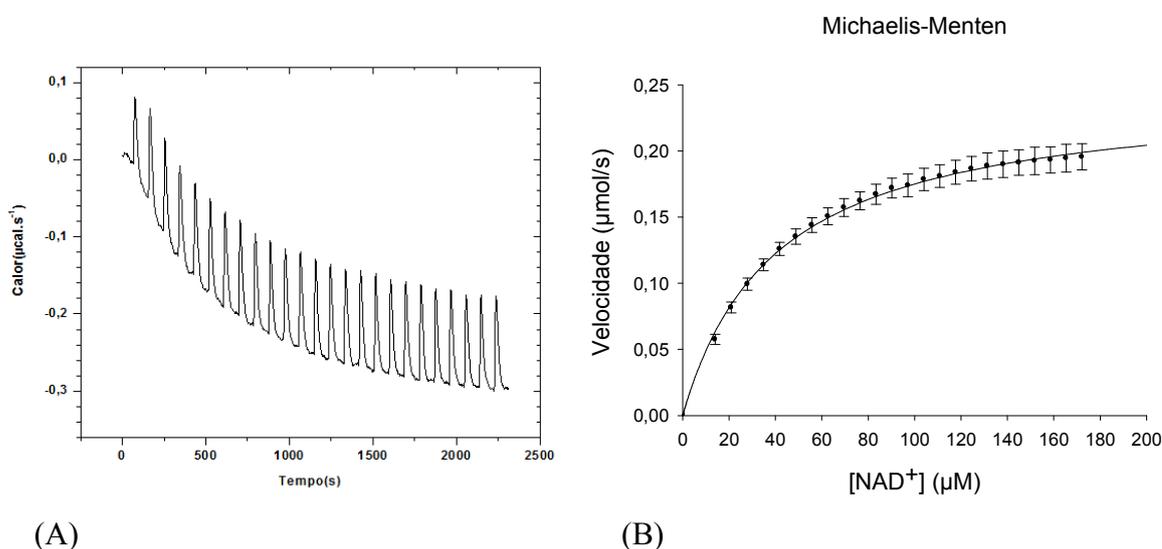


Figura 4.1. (A) curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima GAPDH. (B) Ajuste dos dados à equação de Michaelis-Menten.

Após a estabilização da linha base, verifica-se uma inflexão desta até a sua nova estabilização em um nível inferior. Esse decréscimo da potência térmica fornecida pelo instrumento indica que a reação de conversão substrato em produto é exotérmica. Esse processo é repetido nas próximas injeções, até que a enzima fique totalmente saturada com o substrato (a partir da 16<sup>a</sup> injeção).

Os valores de  $V_{\text{máx}}$ ,  $K_M$  e  $k_{\text{cat}}$  da enzima *TcGAPDH* foram calculados e se encontram na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Constantes cinéticas calculadas para a enzima *Tc*GAPDH em relação o cofator  $\text{NAD}^+$

Parâmetros	Valores	95% Intervalo de confiança
$V_{\max}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$0,24 \pm 0,01$	0,23 a 0,27
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$40,14 \pm 3,13$	33,90 a 46,39
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$51,37 \pm 0,33$	
$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )	1,28	
$R^2$		0,917
$\text{Sy.x}^*$		0,011

\*Desvio padrão dos resíduos

Estudos anteriores [75] demonstraram que o valor de  $K_M$  da enzima diminui significamente na presença de DMSO. Sendo o  $K_M$  considerado a medida da afinidade da enzima pelo substrato, pode-se sugerir que a afinidade da enzima pelo substrato aumenta na presença do co-solvente. Possivelmente o co-solvente provoca uma expulsão de moléculas de água da superfície da enzima próxima do sítio ativo, facilitando o encontro da enzima com o substrato. Sendo assim, os parâmetros cinéticos do  $\text{NAD}^+$  foram determinados na presença de 5% de DMSO.

## 4.2 Determinação da constante e mecanismo de inibição dos compostos avaliados

Uma vez que os compostos testados (Figura 4.2) eram parecidos com o  $\text{NAD}^+$  a reação cinética foi realizada em relação à pseudo-primeira ordem para este substrato. Além da determinação da constante de inibição aparente ( $K_i^{\text{app}}$ ) também foi possível determinar o mecanismo de inibição das moléculas que se apresentaram ativas contra a enzima *Tc*GAPDH.

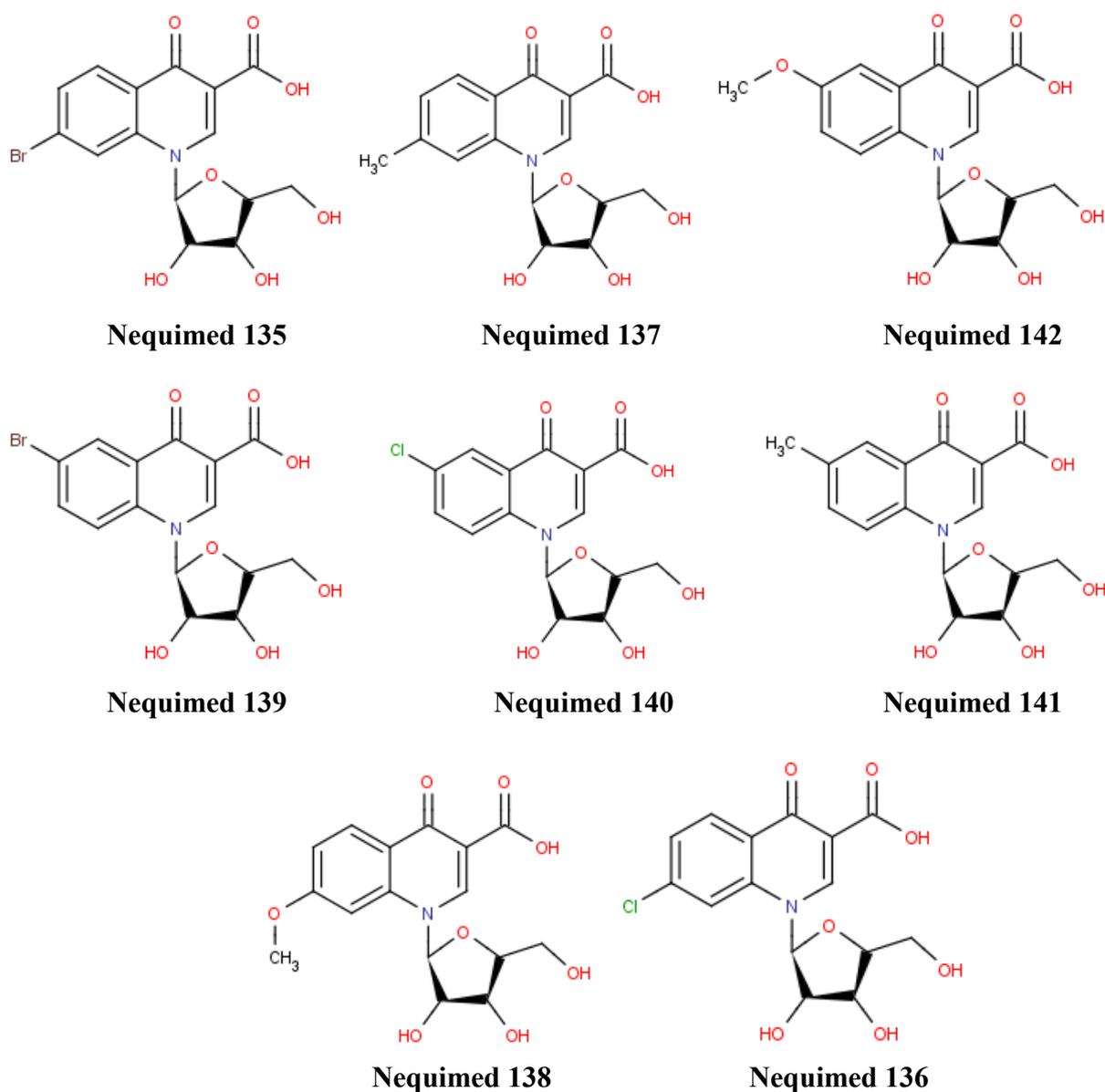


Figura 4.2. Estruturas das moléculas análogas ao  $\text{Nad}^+$  testadas contra a enzima *TcGAPDH*,

As constantes de inibição foram obtidas pelo ajuste não linear dos dados experimentais no programa *SigmaPlot* 10,0, no modo “análise cinética enzimática”.

Foi realizado o ensaio cinético de oitos moléculas, sendo todas ativas e apresentaram mecanismos de inibição competitivos em relação ao  $\text{NAD}^+$ . Inibidores dessa classe se ligam exclusivamente a enzima livre e competem com o substrato pelo sitio ativo da enzima. Dessa forma, a enzima se liga ao substrato ou ao inibidor. Assim, para que a reação alcance metade da

velocidade máxima tem ter um aumento da concentração de substrato, o que leva a um aumento no valor de  $K_M$ . [48] Os resultados obtidos estão de acordo com essa afirmação, já que para todos os compostos que estão listados na Tabela 4.2 o valor de  $K_M$  aumentou na presença deles.

Tabela 4.2. Valores de  $K_i^{app}$ ,  $K_M$  e mecanismo de inibição.

Compostos	$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_i^{app}$ ( $\mu\text{M}$ )	Mecanismo
NEQUIMED135	49,98 $\pm$ 8,73 (42,07 $\pm$ 2,38)*	15,98 $\pm$ 1,27	Competitivo
NEQUIMED137	46,94 $\pm$ 2,52 (37,71 $\pm$ 2,01)	17,10 $\pm$ 1,00	Competitivo
NEQUIMED142	46,98 $\pm$ 2,25 (37,51 $\pm$ 1,27)	18,67 $\pm$ 0,96	Competitivo
NEQUIMED139	62,57 $\pm$ 2,33 (37,13 $\pm$ 1,93)	29,53 $\pm$ 1,31	Competitivo
NEQUIMED140	63,35 $\pm$ 2,37 (38,83 $\pm$ 0,74)	32,27 $\pm$ 0,99	Competitivo
NEQUIMED141	48,51 $\pm$ 3,18 (37,13 $\pm$ 1,93)	57,61 $\pm$ 3,84	Competitivo
NEQUIMED138	67,73 $\pm$ 3,71 (39,11 $\pm$ 0,73)	59,49 $\pm$ 2,27	Competitivo
NEQUIMED136	56,74 $\pm$ 7,19 (39,74 $\pm$ 0,88)	91,25 $\pm$ 10,17	Competitivo
<b><math>K_M</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>			
<b>NAD<sup>+</sup></b>	40,14 $\pm$ 3,13		

\*Os valores entre parênteses foram obtidos na ausência de inibidor

Os parâmetros estatísticos dos dados referentes à Tabela 4.2 estão descritos na Tabela 4.3.

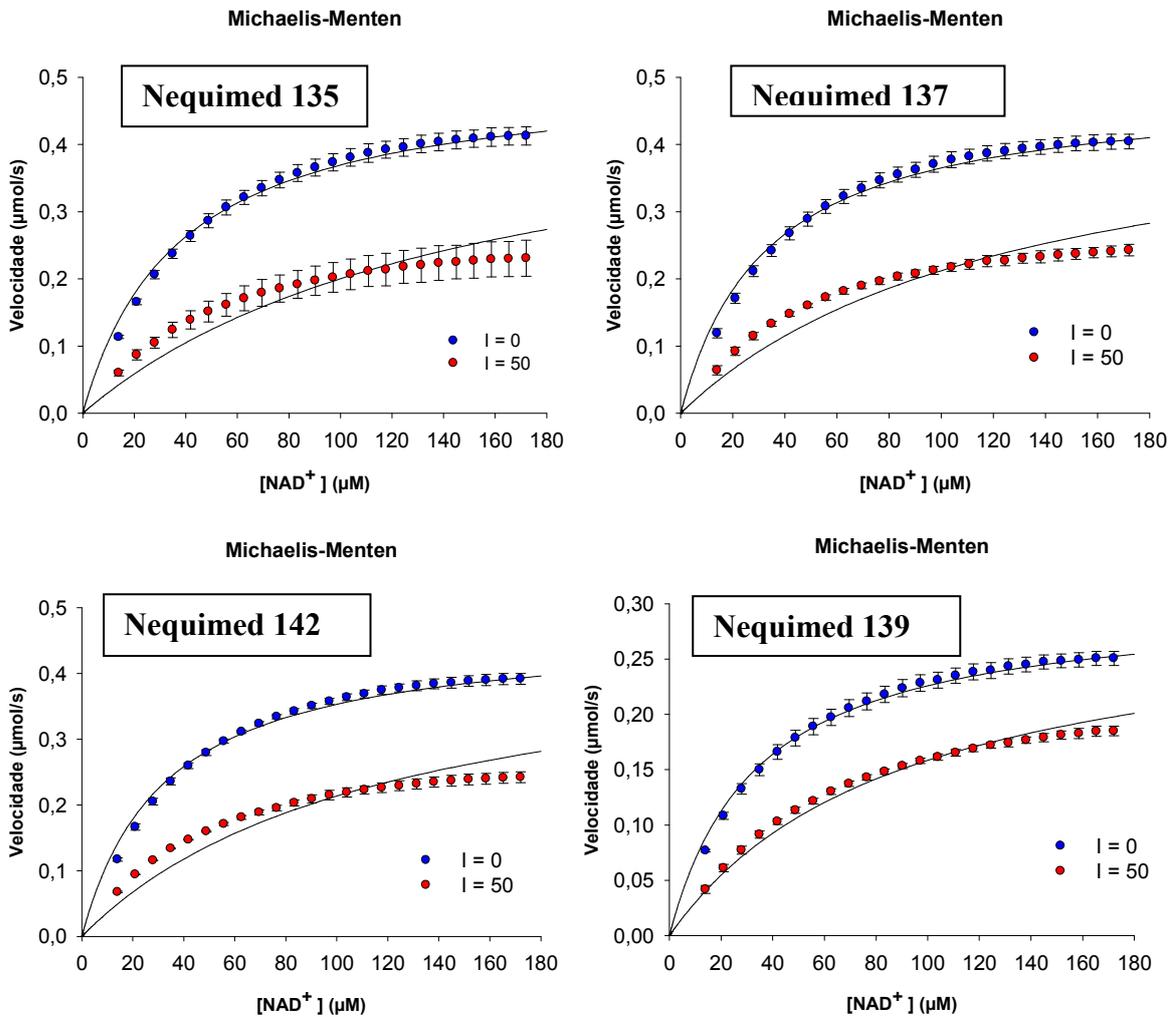
Tabela 4.3. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais.

	AICc <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	Soma dos Quadrados	Sy.x <sup>b</sup>	Valor teste $p^c$
NEQUIMED135	-1.010,61	0,92	0,12	2,94 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,001
NEQUIMED137	-1.111,48	0,96	0,06	2,07 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,001
NEQUIMED142	-1.160,74	0,96	0,04	2,00 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,001
NEQUIMED139	-1.348,52	0,97	0,01	9,09 x 10 <sup>-3</sup>	< 0,001
NEQUIMED140	-1.517,80	0,99	0,003	5,05 x 10 <sup>-3</sup>	< 0,001
NEQUIMED141	-1.298,13	0,95	0,01	1,08 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,500
NEQUIMED138	-1.506,56	0,98	0,004	5,25 x 10 <sup>-3</sup>	< 0,001
NEQUIMED136	-1.264,34	0,92	0,02	1,20 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,001

<sup>a</sup> Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

<sup>b</sup> Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear. <sup>c</sup> Quanto menor o valor de  $p$ , melhor o ajuste do modelo estatístico.

Outra característica da inibição competitiva fica evidente na análise do gráfico de Michaelis-Menten (Figura 4.3): a velocidade máxima não se altera na presença de um inibidor competitivo, como pode ser observado nos gráficos dos compostos que se encontram abaixo.



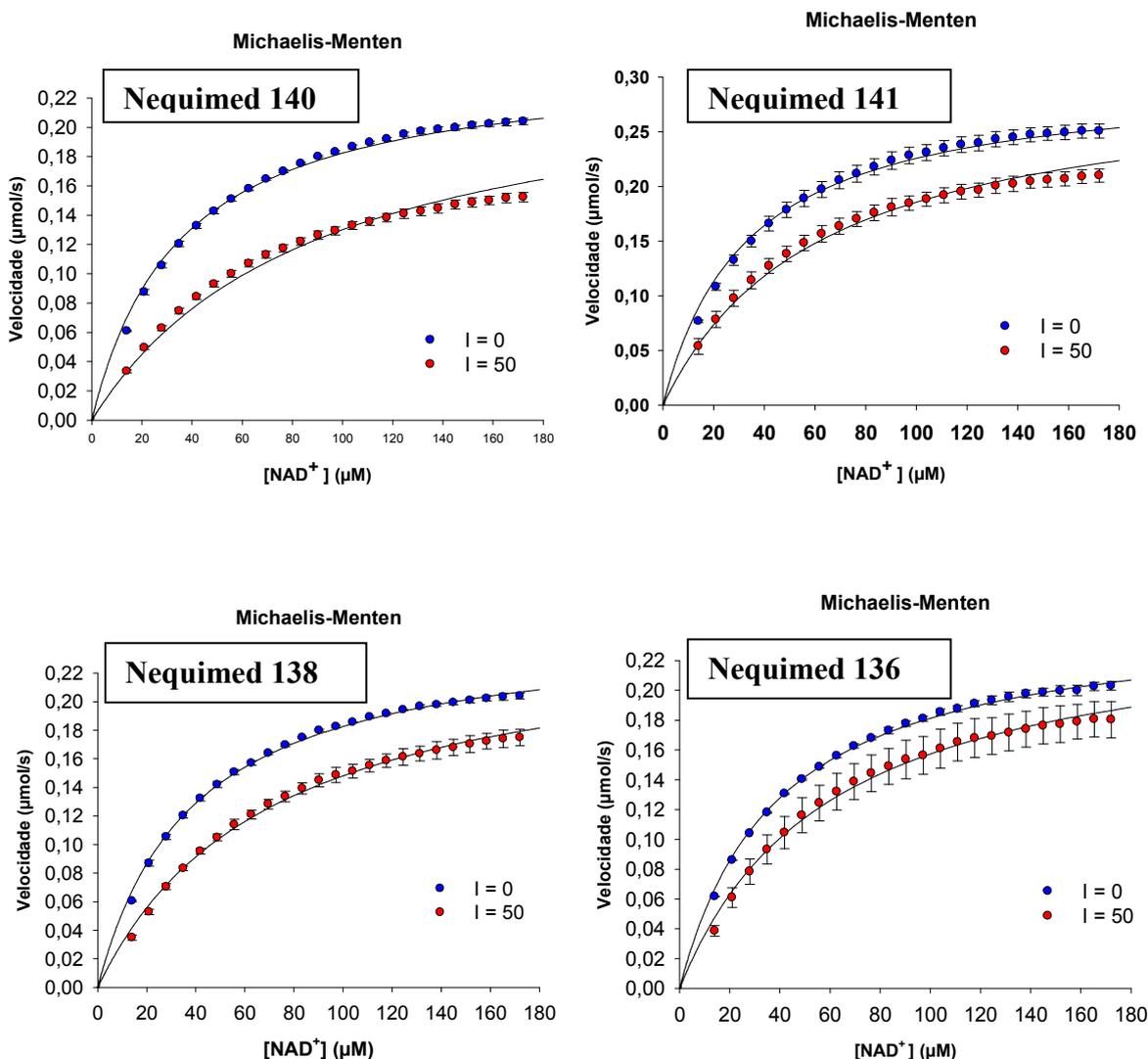


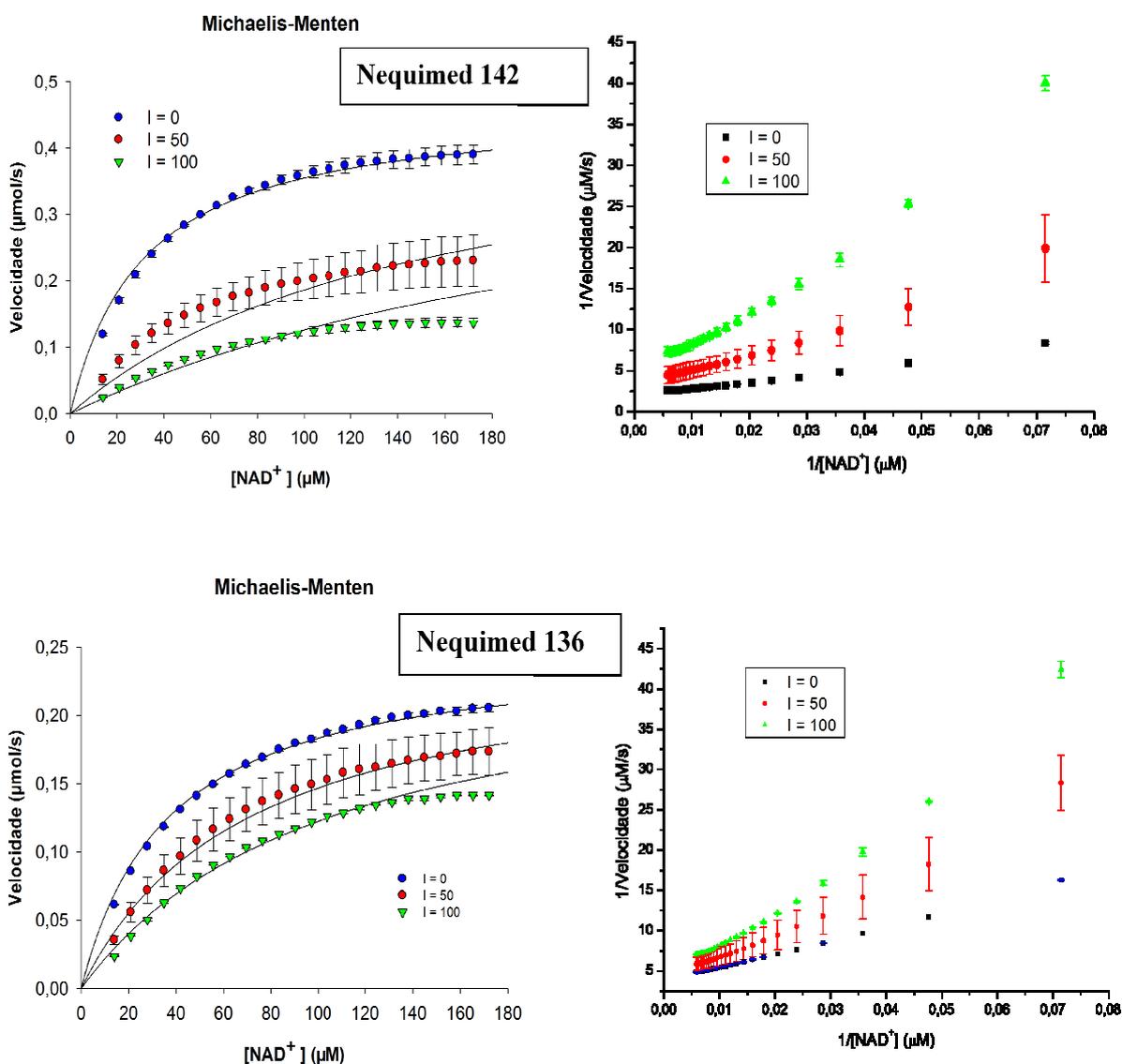
Figura 4.3. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição competitiva contra a enzima *TcGAPDH* no sítio do NAD<sup>+</sup>. Curva em azul: experimento controle (I = 0), Curva em vermelho: concentração do inibidor igual a 50 µM.

Os compostos são nucleosídeos análogos ao cofator NAD<sup>+</sup> e apresentaram  $K_i^{app}$  variando aproximadamente de 16 a 92 µM, dentre os quais cinco (Nequimed135, Nequimed137, Nequimed142, Nequimed139 e Nequimed140) apresentaram uma afinidade maior que o próprio NAD<sup>+</sup> pela enzima. Um fator importante a se observar é que aqueles compostos que apresentavam substituintes com maior volume – grupos brometo (Br) e metóxi (OMe) – foram os que apresentaram maior inibição contra a enzima.

### 4.3 Estudo da variação da concentração dos inibidores da enzima *Tc*GAPDH

Para a confirmação do mecanismo de inibição dos compostos o ensaio de inibição foi repetido para diferentes concentrações dos inibidores. Através de um rearranjo matemático das curvas de Michaelis-Menten obtidas experimentalmente, é obtido o gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk para tais compostos.

Na Figura 4.4 estão os gráficos obtidos para os compostos que tiveram sua concentração variada.



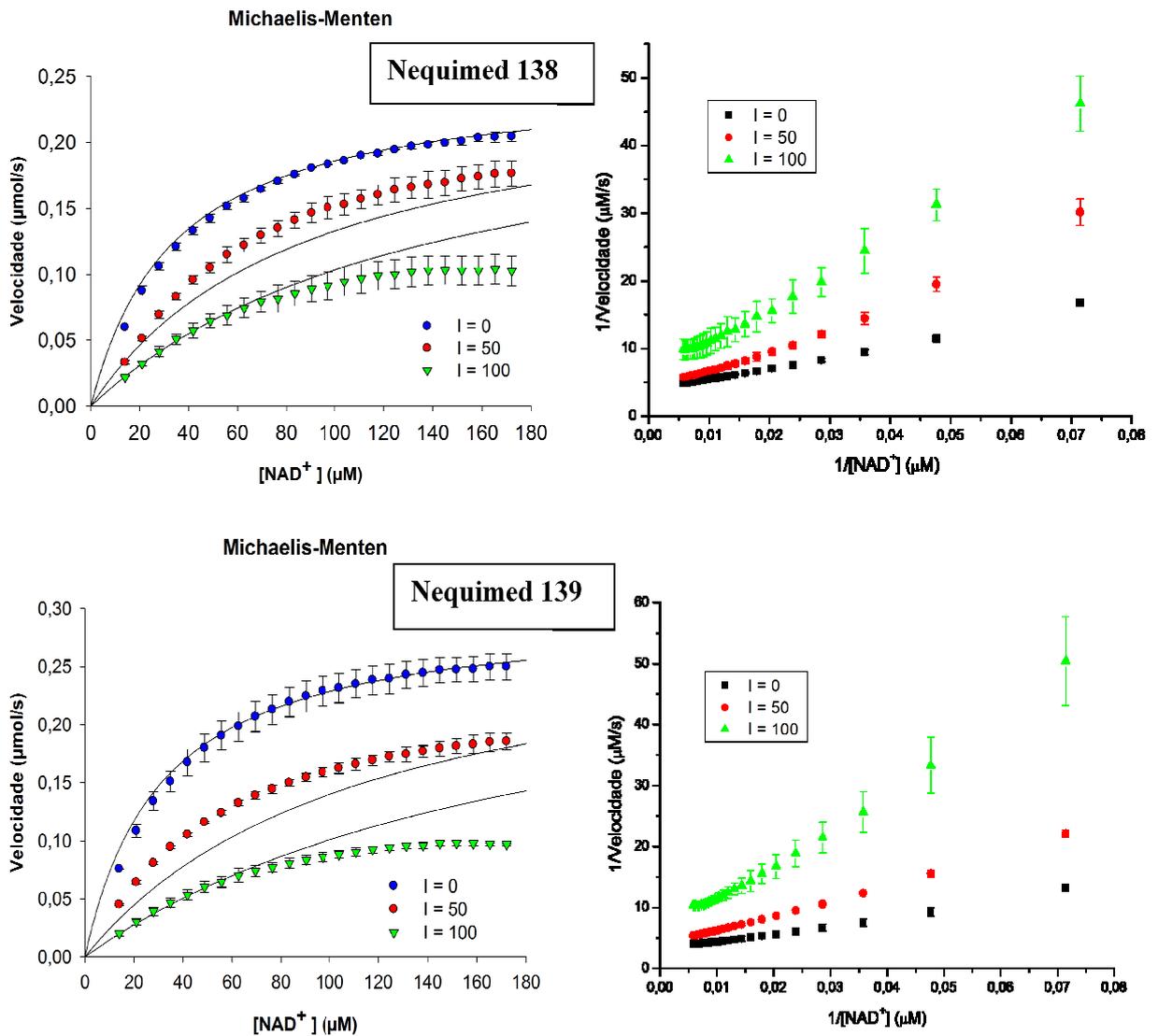


Figura 4.4. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição competitiva contra a enzima *TcGAPDH* no sítio do NAD<sup>+</sup>. Curva em azul: experimento controle ( $I = 0$ ); Curva em vermelho: concentração do inibidor igual a 50  $\mu\text{M}$ ; Curva em verde : concentração do inibidor igual a 100  $\mu\text{M}$ .

Os parâmetros estatísticos dos ajustes referentes aos estudos experimentais representados na Figura 4.4 encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais.

	AICc <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	Soma dos Quadrados	Sy.x <sup>b</sup>	Valor teste p <sup>c</sup>
NEQUIMED142	-1.065,42	0,95	0,08	2,43 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,001
NEQUIMED136	-1.316,03	0,95	0,01	1,02 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,001
NEQUIMED138	-1.206,54	0,91	0,03	1,49 x 10 <sup>-2</sup>	< 0,001
NEQUIMED139	-1.148,86	0,93	0,04	1,82 x 10 <sup>-2</sup>	<0,500

<sup>a</sup> Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

<sup>b</sup> Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear. <sup>c</sup> Quanto menor o valor de  $p$ , melhor o ajuste do modelo estatístico.

O ajuste matemático das curvas de Michaelis-Menten para o gráfico de Lineweaver-Burk nos sugere que os inibidores demonstraram ser competitivos. Porém, observa-se que as curvas não se ajustam completamente ao modelo teórico. A fim de se estudar este comportamento foi realizado um ajuste para o gráfico de Eadie-Hofstee (Figura 4.5). O gráfico de Eadie-Hofstee relaciona a velocidade da reação enzimática pela razão entre a velocidade e a concentração de substrato.[76] Para uma enzima que apresenta comportamento cinético do tipo Michaelis-Menten é esperado que seja formada uma reta com inclinação igual a  $-K_M$ , com intersecção nos eixos x e y iguais a  $V_{max}/K_M$  e  $V_{max}$ , respectivamente, como mostrado na Figura 4.5a.

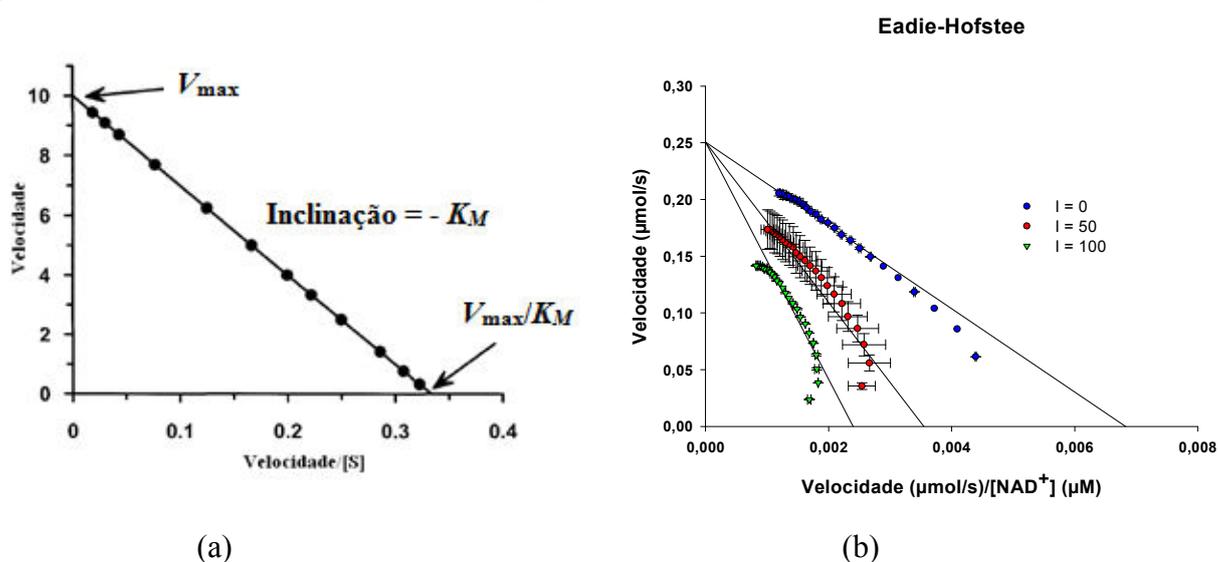


Figura 4.5. Ajuste de Eadie-Hofstee do Nequimed136

Pelo fato da GAPDH utilizar um substrato e um cofator para a catálise, um modelo cinético “Michaeliano” se torna possível apenas quando uma dessas espécies esteja em altas concentrações, de forma que a reação se processe seguindo cinética de pseudo-primeira ordem. Dessa forma, por limitações do modelo cinético de pseudo-primeira ordem para a GAPDH, foi observado desvios da linearidade no gráfico de Eadie-Hofstee quando houve variação das concentrações dos inibidores. Isso sugere que o substrato ou o cofator interfere na ligação do outro com a enzima, o que leva ao fenômeno de cooperatividade. Para comprovação deste mecanismo cinético é necessário um estudo mais detalhado a respeito do mecanismo de catalise da enzima, bem como a interação entre o  $\text{NAD}^+$  e o G3P.

Observando os gráficos da Figura 4.4 e os dados da Tabela 4.5 nota-se um efeito de cooperatividade positiva sobre a cinética de reação enzimática. A inclusão de inibidor aumenta o efeito de cooperatividade.

Tabela 4.5. Parâmetros do estudo de cooperatividade do composto Nequimed136

Nequimed136	$V_{max}$	Intervalo de confiança	$h^a$	Intervalo de confiança	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo de confiança
0 $\mu\text{M}$	$0,24 \pm 0,003$	0,24 a 0,25	$1,13 \pm 0,02$	1,08 a 1,18	$57,97 \pm 4,10$	49,70 a 66,23
50 $\mu\text{M}$	$0,20 \pm 0,02$	0,16 a 0,25	$1,31 \pm 0,25$	0,79 a 1,83	$147,1 \pm 115,4$	0,0 a 379,8
100 $\mu\text{M}$	$0,17 \pm 0,001$	0,17 a 0,17	$1,43 \pm 0,02$	1,38 a 1,48	$276,8 \pm 21,55$	233,4 a 320,2

<sup>a</sup> Coeficiente de Hill

Os parâmetros estatísticos dos ajustes referentes aos estudos representados na Tabela 4.5 encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6. Parâmetros estatísticos dos ajustes dos estudos experimentais.

Nequimed136	Graus de Liberdade	$R^2$	Soma dos Quadrados	$Sy.x$
0 $\mu\text{M}$	45	0,99	$1,54 \times 10^{-4}$	$1,15 \times 10^{-3}$
50 $\mu\text{M}$	45	0,86	$1,20 \times 10^{-2}$	$1,62 \times 10^{-2}$
100 $\mu\text{M}$	45	0,99	$7,16 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-3}$

Considerando-se os resultados acima e o fato de que a GAPDH tem subunidades cooperativas que podem influenciar no mecanismo de ação, é possível que o gráfico da velocidade como função da concentração do substrato seja sigmoidal. Os dados mostrados na Tabela 4.5 sugerem que o coeficiente de Hill é maior que 1 e uma cooperatividade positiva do substrato pode ser observada. A Figura 4.6 mostra o ajuste não linear. Embora esse efeito explique um pequeno desvio da cinética de Michaelis-Menten, o efeito é aumentado quando há inclusão de inibidor, com aumento subsequente por aumento de sua concentração.

Na cooperatividade positiva do substrato, a interação do primeiro substrato no primeiro sítio ativo estimula a forma ativa da enzima e promove a interação do segundo substrato ( $h_{\text{aparente}} = h_{\text{H}} = 1,13$ ). Claramente, a presença de inibidor diminui a atividade da enzima e aumenta o valor de  $K_i$  aumentando a cooperatividade ( $h_{\text{H}} = 1,31$  e  $1,43$ ). Estes efeitos moderados de cooperatividade embora bem modelados, não resultam em valores de  $h_{\text{H}}$  representativos do número de sítios de interação. Isto é provável por força da condição de estado estacionário aplicada nos experimentos realizados neste trabalho, já que esse sistema não satisfaz o requerimento de rápido equilíbrio apropriado para a análise de Hill.

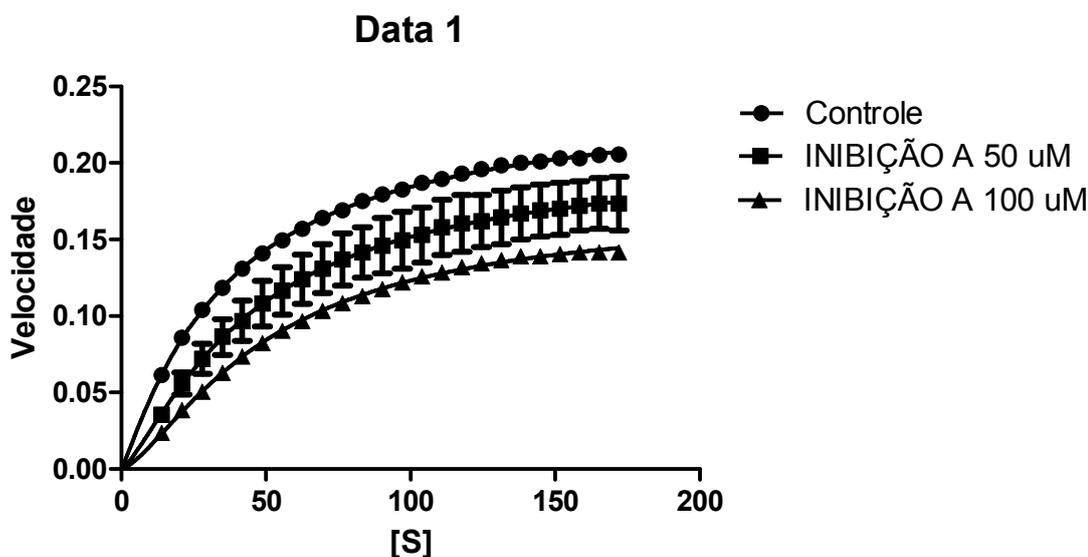


Figura 4.6. Ajuste não linear do composto Nequimed136

#### 4.4 Estudo da inibição dos compostos frente ao G3P

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase possui dois sítios, o sítio do cofator  $\text{NAD}^+$  e o sítio de ligação do G3P. Com a finalidade de determinar de forma inequívoca o mecanismo de inibição e de avaliar a inibição enzimática desses compostos em outro sítio da enzima, os compostos foram testados contra o sítio do G3P. Para tal os parâmetros cinéticos do G3P foram determinados como mostrado na tabela a seguir:

Tabela 4.7. Constantes cinéticas para a enzima *Tc*GAPDH em relação ao substrato G3P

Parâmetros	Valores	95% Intervalo de confiança
$V_{\max}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$0,63 \pm 6,51 \times 10^{-3}$	0,62 a 0,64
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$34,10 \pm 1,23$	31,63 a 36,57
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$146 \pm 0,61$	
$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )	4,28	
$R^2$		0,986
$\text{Sy.x}^*$		0,011

\*Desvio padrão dos resíduos

Foi realizado o ensaio cinético de quatro moléculas, sendo todas ativas e apresentaram mecanismos de inibição não-competitivos em relação ao G3P. Inibidores dessa classe se ligam tanto a enzima livre quanto ao complexo ES e não competem com o substrato pelo sitio ativo da enzima. Os resultados para este estudo se encontram na Figura 4.7 abaixo.

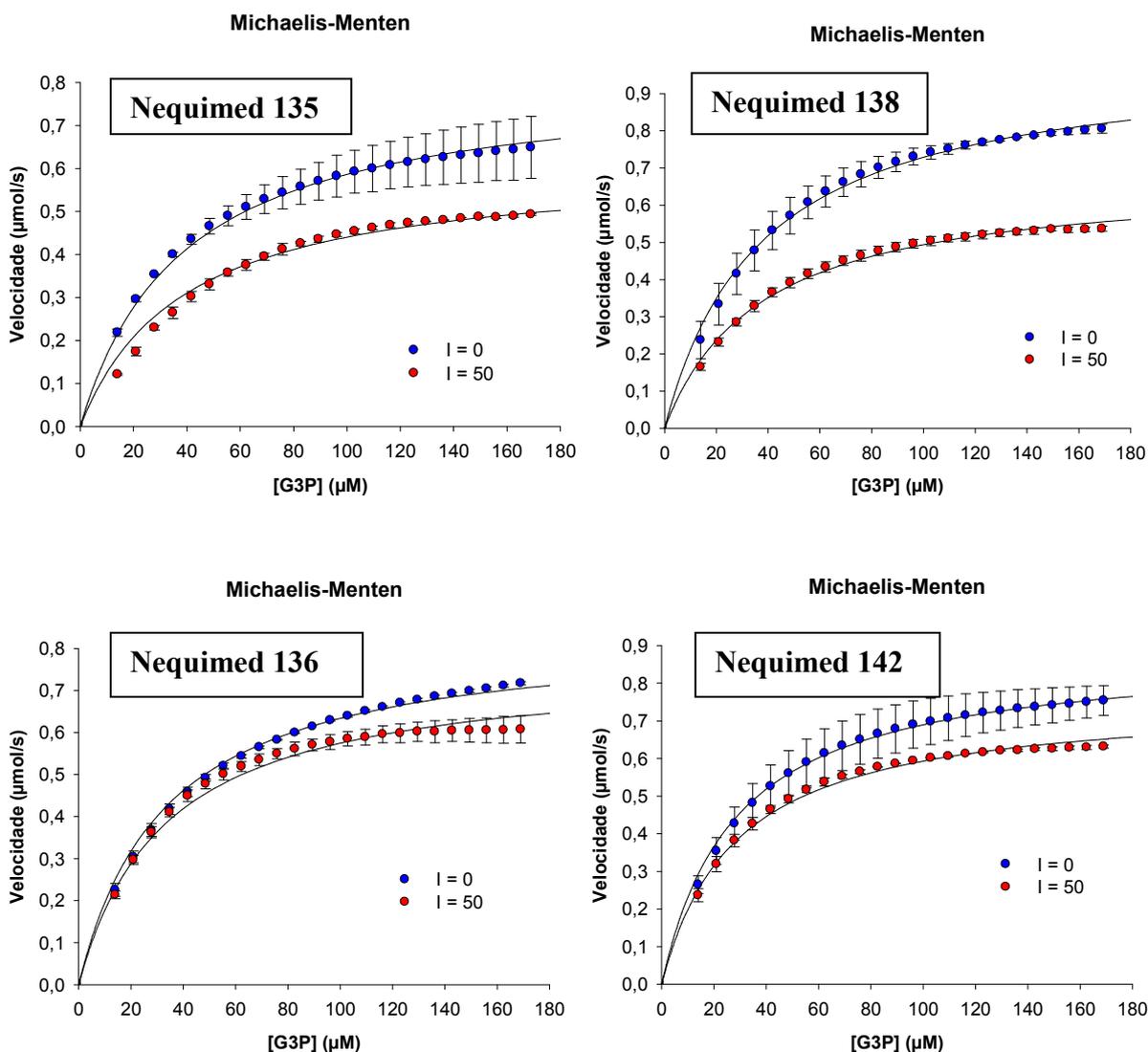


Figura 4.7. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição não-competitivo contra a enzima *TcGAPDH* no sítio do G3P. Curva em azul: experimento controle ( $I = 0$ ); Curva em vermelho: concentração do inibidor igual a 50  $\mu\text{M}$ .

Os quatro compostos testados apresentaram mecanismo de inibição não-competitivo nos ensaios contra o sítio do G3P, o que é mais uma prova de que eles interagem competitivamente com o  $\text{NAD}^+$ . Apresentaram um  $K_i^{app}$  variando de 105 a 486  $\mu\text{M}$ . Os parâmetros estatísticos dos ajustes representados na Figura 4.7 e o valor da constante de inibição aparente ( $K_i^{app}$ ) encontram-se na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Parâmetros estatísticos dos ajustes do estudos experimentais e os valores de  $K_i^{app}$  (em  $\mu\text{M}$ ) das substâncias testadas contra a TcGAPDH no sítio de ligação do G3P.

	AICc <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	Soma dos Quadrados	Sy.x <sup>b</sup>	Valor teste $p^c$	$K_i^{app}$ ( $\mu\text{M}$ )	Intervalo de Confiança
<b>NEQUIMED135</b>	-629,492	0,93	0,12	0,04	< 0,001	150,94 ± 3,62	131,52 a 170,36
<b>NEQUIMED138</b>	-591,277	0,93	0,07	0,02	< 0,001	105,10 ± 3,39	98,37 a 111,8
<b>NEQUIMED136</b>	-736,035	0,97	0,04	0,02	< 0,001	485,97 ± 39,81	406,91 a 565,0
<b>NEQUIMED142</b>	-608,767	0,91	0,15	0,04	< 0,001	305,44 ± 30,41	245,05 a 365,84

<sup>a</sup> Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste.

<sup>b</sup> Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear. <sup>c</sup> Quanto menor o valor de  $p$ , melhor o ajuste do modelo estatístico.

## 4.5 Determinação da eficiência do ligante

A eficiência do ligante tem se mostrado como um parâmetro importante na descoberta de fármacos. Esse parâmetro pode ser utilizado para determinar a qualidade dos ligantes obtidos no ensaio inicial. Hopkins[77] definiu a eficiência do ligante como:

$$LE = -\frac{\Delta G}{HAC} = -\frac{RT \ln K_d}{HAC} \approx \frac{-RT \ln IC_{50}}{HAC} \quad \text{Equação 15}$$

onde  $\Delta G$  é a energia de interação do ligante por uma alvo específico, HAC é o número de átomos pesados (diferentes de hidrogênio) e a constante de dissociação ( $K_d$ ) pode ser substituída pelo valor de  $K_i$ , como uma medida aproximada da afinidade do ligante pelo alvo. Para um ligante ser considerado viável, um bom valor de eficiência do ligante é de aproximadamente 0,29 kcal mol<sup>-1</sup> átomo<sup>-1</sup>. A Figura 4.8 ilustra como o conceito de eficiência do ligante está relacionado com as possibilidades de um determinado composto ser otimizado e ao final possuir não só afinidade alvo, mas também características físico-químicas que permitam o ajuste fino de suas propriedades farmacocinéticas. [78]

O valor de  $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$  é visto como a eficiência do ligante mínima necessária para que um composto, depois de otimizado, possua uma característica fármaco-similar, e é representado pela linha transversal que separa as regiões de alta e baixa eficiência do ligante no gráfico. Quanto mais próximo da área de alta eficiência do ligante um determinado composto se localizar, maior a possibilidade do mesmo ser otimizado. Assim, fragmentos moleculares são geralmente mais promissores que moléculas similares a compostos líderes, que por sua vez são mais promissoras que a maioria das moléculas geralmente encontradas através de ensaios em massa.

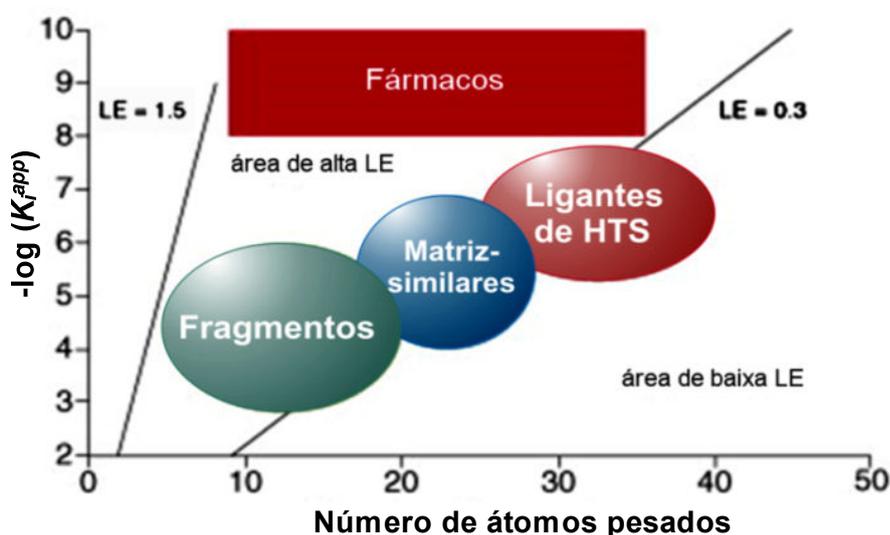


Figura 4.8. Evolução do ligante a composto-matriz partindo de diferentes espaços químicos. Figura adaptada.<sup>47</sup>

Para se tornar um candidato a composto-matriz, o ligante precisa ter sua potência melhorada, isto ocorrendo quase sempre em paralelo com um aumento da massa molecular. [79] Os ligantes que provem da técnica de HTS apresentam uma extensa faixa de massas moleculares (250-600 Da) e geralmente exibem afinidade na faixa de baixo  $\mu\text{M}$  até alto nM. [79] A otimização de um número significativo desses ligantes dificilmente irá produzir moléculas que se enquadram no espaço químico definido pela *regra dos cinco* de Lipinski [80], que estabeleceu alguns parâmetros estruturais relevantes -

massa molecular menor que 500 Da, LogP menor que 5, número de grupamentos doadores de ligação hidrogênio menor que 5, número de grupamentos aceitadores de ligação hidrogênio menor que 10 - para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral e é utilizada como um guia qualitativo para predizer se as moléculas apresentarão boa absorção e permeabilidade.

Como os ligantes com características de *fragmentos moleculares* [81, 82] apresentam menor complexidade, ou seja, menor massa molecular são capazes de fazer interações mais específicas, podendo se ajustar com maior facilidade no sítio do alvo. Assim, na otimização dessas moléculas, não só a afinidade aumenta, mas também o perfil farmacocinético adequado é mantido. [80]

Na Tabela 4.9 são apresentados a eficiência do ligante, a massa molecular e o número de átomos pesados dos compostos em estudo.

Tabela 4.9. Eficiência do ligante dos inibidores da *TcGAPDH*.

<b>Compostos</b>	<b>MM*</b>	<b>HAC**</b>	<b><math>K_i^{app}</math> (μM)</b>	<b>LE*** (kcal mol<sup>-1</sup> átomo<sup>-1</sup>)</b>
<b>NEQUIMED135</b>	400,18	24	15,98 ± 1,27	0,27
<b>NEQUIMED137</b>	335,31	24	17,57 ± 1,08	0,27
<b>NEQUIMED142</b>	351,31	25	18,67 ± 0,96	0,26
<b>NEQUIMED139</b>	400,18	24	29,53 ± 1,31	0,26
<b>NEQUIMED140</b>	355,73	24	32,27 ± 0,99	0,25
<b>NEQUIMED141</b>	335,31	24	57,61 ± 3,84	0,24
<b>NEQUIMED138</b>	351,31	25	59,49 ± 2,27	0,23
<b>NEQUIMED136</b>	355,73	24	91,25 ± 10,17	0,23

\*Massa Molecular; \*\* Número de átomos diferentes de hidrogênio; \*\*\* Eficiência do ligante

Os compostos estudados e que foram ativos contra *TcGAPDH*, apresentam massa molecular em torno de 350Da e 25 átomos pesados. A eficiência do ligante dos compostos é por volta de 0,27 kcal mol<sup>-1</sup> átomo<sup>-1</sup>, ou seja, apresentam uma eficiência do ligante muito próxima do valor ideal, o que os tornam compostos possíveis de serem otimizados.

## 4.6 Estudo da seletividade dos compostos análogos ao NAD<sup>+</sup> frente à GAPDH de humanos (*HsGAPDH*)

Um ponto de fundamental importância no estudo de inibidores enzimáticos de agentes causadores de doenças é a seletividade. Dessa forma os compostos foram testados contra a enzima GAPDH de humanos, uma vez que o objetivo é que estas inibam a enzima GAPDH presente no parasito, porém que seja seletiva a enzima GAPDH de humanos.

Os parâmetros cinéticos do NAD<sup>+</sup> da enzima *HsGAPDH* foram calculados. Os resultados experimentais obtidos foram ajustados graficamente a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros cinéticos  $V_{\text{máx}}$  e  $K_M$  obtidos por ajuste não-linear. Os valores obtidos encontram-se na Tabela 4.10.

Tabela 4.10. Valores de  $K_i^{\text{app}}$ ,  $K_M$  e mecanismo de inibição

Parâmetros	Valores	95% Intervalo de confiança
$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{M s}^{-1}$ )	$0,32 \pm 0,001$	0,32 a 0,33
$K_M$ ( $\mu\text{M}$ )	$22,31 \pm 0,48$	21,36 a 23,27
$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$685 \pm 4,1$	
$k_{\text{cat}}/K_M$ ( $\times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ )	30,70	
$R^2$		0,989
Sy.x*		0,04

\*Desvio padrão dos resíduos

Um ponto importante a se observar é que o  $K_M$  do NAD<sup>+</sup> da enzima *HsGAPDH* é menor que o  $K_M$  da enzima *TcGAPDH*, isso demonstra que o cofator NAD<sup>+</sup>, possui uma maior afinidade pela enzima GAPDH de humanos, o valor da eficiência catalítica para *HsGAPDH* é maior que da *TcGAPDH*, mostrando que esta enzima é mais eficiente em converter o gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição dos compostos contra enzima *HsGAPDH* encontram-se na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Valores de  $K_i^{app}$ ,  $K_M$  e mecanismo de inibição de HsGAPDH

Compostos	$K_M$ (mM)	$K_i^{app}$ ( $\mu$ M)	Mecanismo
NEQUIMED139	21,89 $\pm$ 1,34 (20,97 $\pm$ 0,40)*	16,03 $\pm$ 1,57	Competitivo
NEQUIMED140	30,45 $\pm$ 0,92 (23,05 $\pm$ 0,46)	23,18 $\pm$ 1,27	Competitivo
NEQUIMED142	23,72 $\pm$ 1,80 (21,29 $\pm$ 0,35)	30,59 $\pm$ 2,37	Competitivo
NEQUIMED136	19,36 $\pm$ -,40 (19,49 $\pm$ 0,62)	51,67 $\pm$ 3,68	Competitivo
NEQUIMED137	25,57 $\pm$ 3,08 (23,58 $\pm$ 0,23)	55,38 $\pm$ 6,19	Competitivo
NEQUIMED138	29,77 $\pm$ 2,95 (23,69 $\pm$ 2,39)	79,87 $\pm$ 12,45	Competitivo
NEQUIMED135	24,09 $\pm$ 2,15 (21,42 $\pm$ 1,17)	160,64 $\pm$ 30,67	Competitivo
NEQUIMED141	19,48 $\pm$ 1,81 (20,76 $\pm$ 0,57)	>1mM	—
		$K_M$ (mM)	
NAD <sup>+</sup>		22,31 $\pm$ 0,48	

\* Os valores entre parênteses foram obtidos na ausência de inibidor.

O composto Nequimed135 inibiu a *TcGAPDH* dez vezes mais do que a *HsGAPDH* e o composto Nequimed141 apresentou uma constante de inibição  $K_i^{app}$  para *HsGAPDH* maior que 1 mM, o que torna estes compostos um bom ponto de partida para otimização visando a seletividade.

## 4.7 Estudo dos análogos nucleosídeos em *Saccharomyces cerevisiae*

### 4.7.1 Estudo do tampão e crescimento das células

Para realização do ensaio celular por espectrofotometria de fluorescência, primeiramente é necessário o estabelecimento das condições ideais para o crescimento da célula. As principais condições a serem estudadas são: o tampão para o crescimento da levedura e o tempo em que a célula atinge um patamar, no qual o número de células no meio permanece estável, antes que elas comecem a morrer.

Foi realizado o estudo com dois tampões com diferentes pHs, a fim de se determinar qual deles seria o melhor para o crescimento das células. Os tampões utilizados nos ensaios foram acetato (pH 4,0 e 5,0) e citrato (pH 5,0). Neste ensaio inicial, foi observado os tampões na concentração de 1 mM. Conforme pode ser visto na Figura 4.9, todas as três condições foram adequadas para manter o meio tamponado durante os estudos de crescimento de levedura.

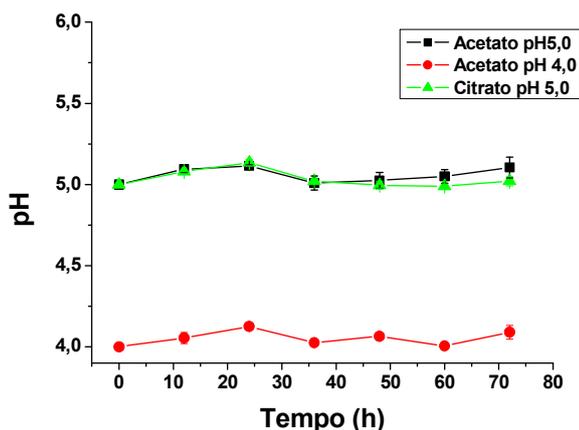


Figura 4.9. Representação gráfica do estudo com tampão. Curva preta: acetato pH 5,0; Curva Verde: citrato pH 5,0; Curva vermelha: acetato pH 4,0.

Para determinar qual o tampão a ser utilizado, foi necessário observar em qual deles as células se multiplicavam mais rapidamente até atingir um patamar de estabilidade da cultura. Estudos da absorbância e a contagem de células foram efetuados com essa finalidade, demonstrado na Figura 4.10.

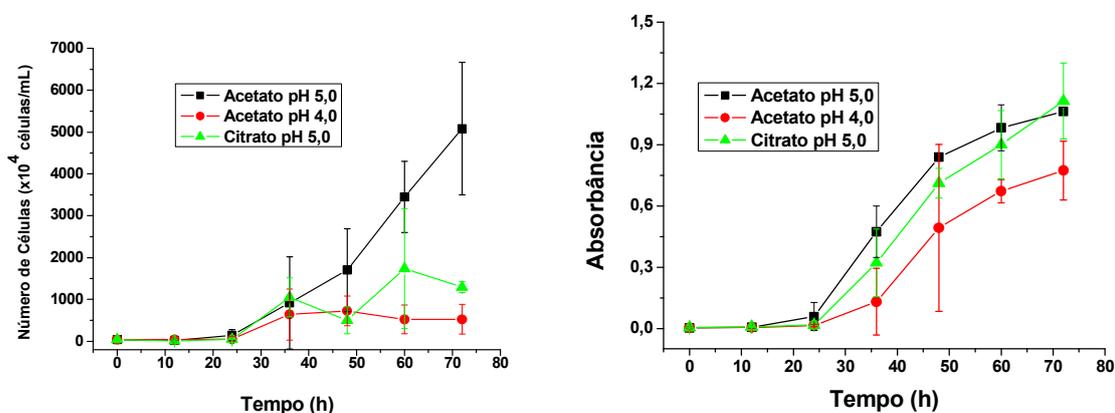


Figura 4.10. Representação gráfica (a) número de células e (b) absorbância a 700 nm. Curva preta: acetato pH 5,0; Curva verde: citrato pH 5,0; Curva vermelha: acetato pH 4,0.

Através da Figura 4.10 podemos observar que o tampão acetato (pH 5,0) foi o mais apropriado para o crescimento celular. Nota-se que o número de células no decorrer do experimento foi bem maior neste tampão. A absorbância (Figura 4.10b) confirma os resultados, pois a levedura atingiu o patamar de crescimento mais rapidamente no tampão acetato pH 5,0 por volta de 60 hs. Portanto este foi o tampão escolhido para o trabalho, juntamente com o tempo necessário para que a cultura seja incubada.

#### 4.7.2 Determinação da concentração de FUN-1

Para realização do ensaio celular foi determinado qual a concentração de FUN-1 a ser utilizada. O resultado deste estudo encontra-se na Figura 4.11.

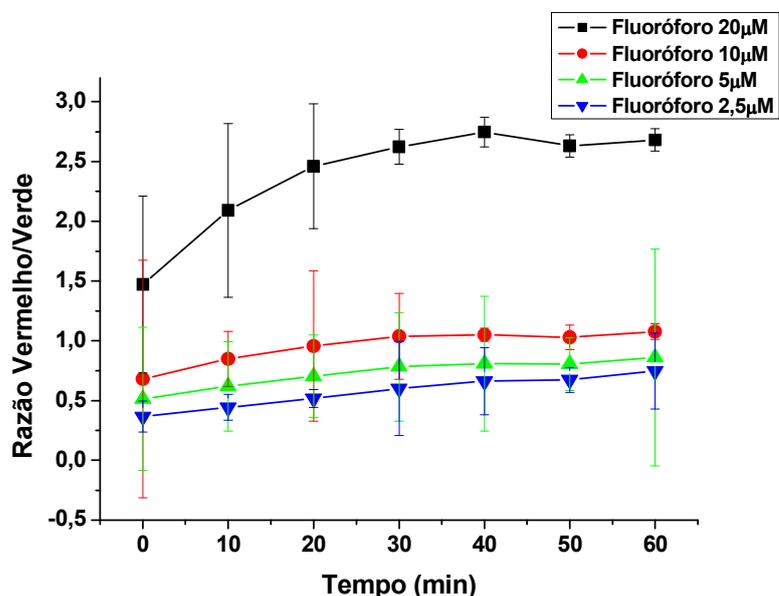


Figura 4.11. Representação gráfica do estudo e diferentes concentrações do FUN-1. Curva preta: fluoróforo 20 μM; Curva vermelha: fluoróforo 10 μM; Curva verde: fluoróforo 5 μM; Curva azul: fluoróforo 2,5 μM

A concentração de FUN-1 que apresentou o melhor resultado foi a 20 μM. Nesta concentração a razão vermelho-verde apresentou a melhor

resposta. Nas demais concentrações a razão vermelho-verde foi baixa, quase não variando entre si.

#### 4.7.3 Ensaio dos inibidores da GAPDH na *Saccharomyces cerevisiae*

Após a determinação da concentração de FUN-1 e porcentagem de DMSO, foi realizado o ensaio com os compostos em uma concentração de 500  $\mu\text{M}$ .

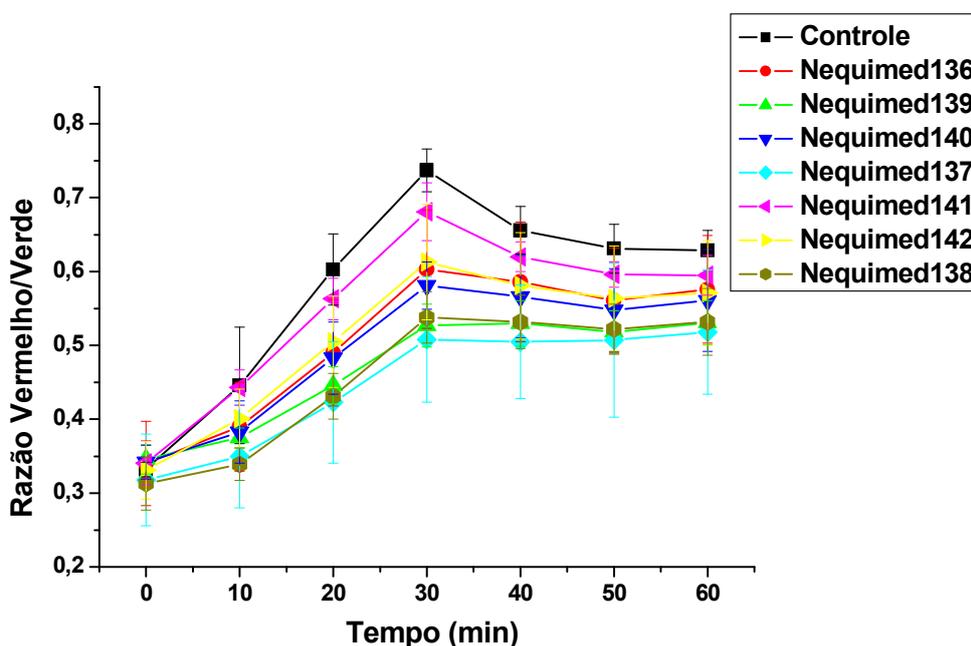


Figura 4.12. Representação gráfica do ensaio celular dos compostos na concentração de 500  $\mu\text{M}$ .

O Nequimed141 não reduziu a viabilidade do *S. cerevisiae*, como pode ser observado na Figura 4.12, enquanto que as outras moléculas apresentaram graus variados de morte celular, observado a partir da redução da razão vermelho/verde.

O fato de alguns compostos desta classe, que possuem estruturas muito semelhantes, terem tido influência sobre o crescimento celular, enquanto outros praticamente não alteraram o crescimento, fornece indícios de que algumas destas moléculas apresentam baixa toxicidade.

Outro fator importante que deve ser destacado é que alguns dos compostos que apresentaram grande afinidade pela enzima *TcGAPDH*, como por exemplo o composto Nequimed142, não tiveram influência tão significativa sobre o crescimento celular, assim, estes compostos têm maior prioridade para o ensaio contra o parasita *T. cruzi*, além de estudos mais detalhados com relação a sua atividade tóxica em células de mamíferos.

#### **4.7.4 Ensaio Dose-Resposta para o composto Nequimed137**

O composto Nequimed137 foi o que apresentou maior atividade tóxica contra o *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 500  $\mu\text{M}$ . Foi realizado um ensaio variando a concentração deste composto a fim de investigar qual seria o seu comportamento em outras concentrações, para complementar as informações até então obtidas por meio de concentração única. Este estudo foi realizado a partir de uma diluição seriada de acordo com as seguintes concentrações: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81  $\mu\text{M}$ . O resultado deste estudo pode ser observado na Figura 4.13.

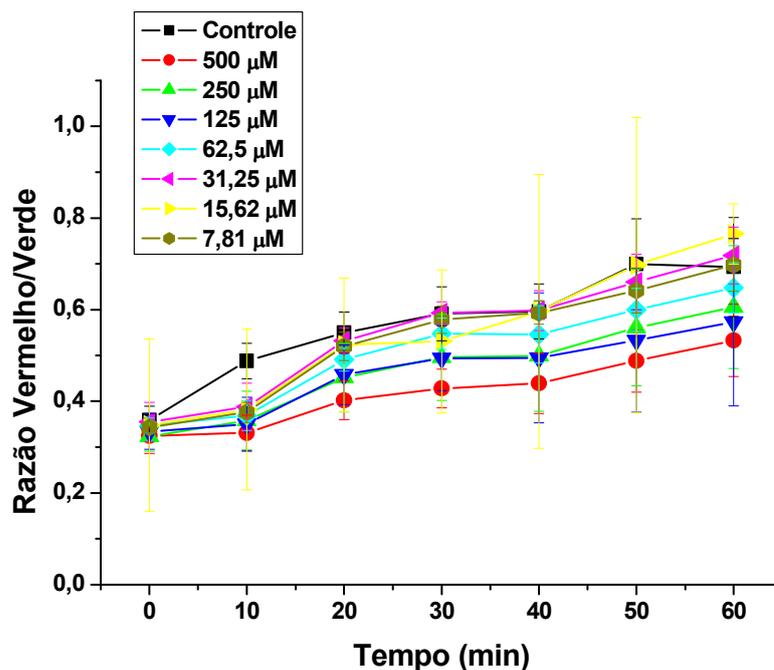


Figura 4.13. Representação gráfica para o estudo com diferentes concentrações do composto Nequimed137. Curva preta: controle (Nequimed137 = 0 µM); Curva Vermelha: Nequimed137 = 500 µM; Curva Verde: Nequimed137 = 250 µM; Curva Azul: Nequimed137 = 125 µM; Curva Ciano: Nequimed137 = 62,5 µM; Curva Magenta: Nequimed137 = 31,25 µM; Curva Amarelo: Nequimed137 = 15,62 µM; Curva Verde-oliva: Nequimed137 = 7,81 µM.

O comportamento da molécula frente à levedura é praticamente o mesmo em todas as concentrações e, assim, este efeito não é realmente tão significativo, sendo mais um indício de que as moléculas não são consideravelmente tóxicas ou não são permeáveis a membrana. Porém para confirmação de alguma destas hipóteses estudos mais detalhados serão necessários. Novos estudos envolvendo células de mamíferos comporão o próximo passo do estudo toxicológico, além da caracterização das outras moléculas por meio de estudos dose-resposta.

## Conclusões

A doença de Chagas é uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo. Em 2009 se completou 100 anos desde a sua descoberta não existindo até hoje tratamentos seguros e eficazes. Os únicos fármacos existentes apresentam severos efeitos colaterais. Nesse contexto, surge a necessidade pela busca por novas moléculas mais eficazes e menos tóxicas é essencial para aliviar o sofrimento de milhões de pessoas que estão infectadas por essa doença.

A calorimetria de titulação isotérmica que é uma técnica bastante sensível, tem sido utilizada com sucesso na identificação de novos e potentes inibidores da enzima *Tc*GAPDH que atuam diretamente como inibidores competitivos para o cofator  $\text{NAD}^+$ . Os compostos estudados neste trabalho são os primeiros análogos do  $\text{NAD}^+$  com baixo peso molecular encontrados como inibidores competitivos. Trabalhos já reportados na literatura,[83] encontraram nucleosídeos como inibidores da *Tc*GAPDH, porém estes apresentavam massa molecular por volta de 900 Da e eficiência do ligante em torno de  $0,15 \text{ kal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$ , o que os torna inviáveis de serem otimizados. Já os compostos estudados neste trabalho apresentam massa moléculas de aproximadamente 350 Da e eficiência do ligante por volta de  $0,27 \text{ kal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$ , ou seja, são moléculas que poderão ser otimizadas, a fim de aumentar sua afinidade pela enzima, e a eficiência do ligante.

Através da ITC foi possível determinar o mecanismo e a constante de inibição das substâncias, obteve-se  $K_i^{app}$  entre 15,98 e 91,25  $\mu\text{M}$  para *Tc*GAPDH e 16,03 e 160,64  $\mu\text{M}$  para a *Hs*GAPDH. O mecanismo de inibição observado para todos os compostos foi o reversível competitivo em relação ao sítio do  $\text{NAD}^+$ . O composto Nequimed141 mostrou-se seletivo não inibindo a GAPDH de humanos e o composto Nequimed135 inibiu a *Tc*GAPDH 10 vezes mais que a *Hs*GAPDH. O mecanismo de inibição competitivo para estes

compostos foi comprovado através do estudo da variação da concentração do inibidor e por meio do ensaio de quatro destes compostos no sítio de ligação do G3P, onde eles apresentaram mecanismo de inibição não-competitivo.

Além da alta afinidade dos compostos, ao se observar a eficiência do ligante, podemos dizer que estas moléculas se caracterizam como ótimas candidatas a serem otimizadas, pois apresentaram uma eficiência do ligante próxima ao valor ideal.

No processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos são utilizados sistemas modelos a fim de se determinar atividade biológica dos compostos em estudo, como é o caso do *Saccharomyces cerevisiae*.

A maioria dos compostos não apresentou nenhuma atividade ou baixa potência contra *S. cerevisiae* a 500  $\mu\text{M}$ , fato este que fornece indícios que muitos destas substâncias podem apresentar baixa citotoxicidade. Estes resultados foram corroborados a partir dos estudos de dose-resposta para o composto Nequimed137, que apresentou maior inibição da atividade da levedura. Este estudo foi de extrema importância para demonstrar quais os compostos mais atrativos para realização do ensaio contra o parasito.

A integração dos ensaios bioquímicos com ensaios celulares demonstrou ser uma estratégia bastante interessante e promissora na busca de novas substâncias bioativas, uma vez que estas estratégias em conjunto nos fornecem resultados bastante interessantes e resultados mais completos a respeito das características bioquímicas e biológicas dos compostos em estudo.

## Perspectivas

O ensaio dos compostos com o alvo macromolecular é uma etapa importante na descoberta e desenvolvimento de substâncias bioativas, porém para dar continuidade na gênese do planejamento de fármacos é importante o estudo destes compostos no parasito *Trypanosoma cruzi*. Essa é uma etapa importante, pois será demonstrado se os compostos realmente apresentam efeitos tripanossomicidas e assim avançar um pouco mais. Dessa forma a nova etapa a ser realizada é o ensaio destes compostos contra o parasito.

Outro ponto importante é a otimização dos compostos, para o aumento de sua atividade e busca pela seletividade, para tal é imprescindível que se tenha uma estrutura cristalográfica do composto interagindo com a enzima para que dessa forma os pontos de vital importância na ligação entre o composto e o alvo macromolecular possam ser identificados e assim a busca de análogos mais potentes e seletivos possa ser realizada.

## Referências Bibliográficas

- [1] LIMA, L. M. "Química Medicinal Moderna: desafios e contribuição brasileira". *Química Nova* **30**: 1456; 2007.
- [2] DREWS, J. "Drug discovery: A historical perspective". *Science* **287**: 1960; 2000.
- [3] MONTANARI, C. A. "A química medicinal na próxima década". *Química Nova* **23**: 134; 2000.
- [4] YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. "Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil". *Química Nova* **24**: 147; 2001.
- [5] WERMUTH, C. G. Medicinal Chemistry: definition and objectives, the three main phases of drug activity, drug and disease classifications. *Practice of Medicinal Chemistry*. Amsterdam: Academic Press; 2003: 29.
- [6] OPREA, T. I.; TROPSHA, A. "Target, chemical and bioactivity databases - integration is key". *Drug Discovery Today: Technologies* **3**: 357; 2006.
- [7] LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. "The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now". *Nature Reviews Drug Discovery* **3**: 853; 2004.
- [8] TAMIMI, N. A. M.; ELLIS, P. "Drug development: From concept to marketing!". *Nephron - Clinical Practice* **113**: c125; 2009.
- [9] GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. "Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas". *Estudos Avançados* **24**: 81; 2010.
- [10] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html> Acesso em: 02 de Março
- [11] CLAYTON, J. "Chagas disease 101". *Nature* **465**: S4; 2010.
- [12] SCHOFIELD, C. J. "Who, how, what and where?". *Nature* **465**: S8.
- [13] ARAÚJO, C. A. C.; WANIEK, P. J.; JANSEN, A. M. "An overview of chagas disease and the role of triatomines on its distribution in Brazil". *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **9**: 227; 2009.
- [14] COURA, J. R.; VINAS, P. A. "Chagas disease: a new worldwide challenge". *Nature* **465**: S6; 2010.
- [15] SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. "Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem". *Acta Tropica* **115**: 14; 2010.
- [16] COURA, J. R.; CASTRO, S. L. D. "A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**: 3; 2002.
- [17] TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. "The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited". *International Journal for Parasitology* **31**: 472; 2001.
- [18] FREITAS, R. F. D. *Integração de Métodos em Quiminformática e Biocalorimetria para o Planejamento de Inibidores da Enzima Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase de Trypanosoma Cruzi*. Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo (USP), 2009. Tese de Doutorado, 154 p. p.
- [19] PESSOA, S. B. M., A. V. *Parasitologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988. p.
- [20] LIMA, F. M.; OLIVEIRA, P.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F.; BAHIA, D. "The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, Trypanosoma cruzi, learned how to modulate signaling events to subvert host cells?". *New Biotechnology* **27**: 837; 2010.
- [21] Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas> Acesso em: 24/07
- [22] NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. "Oral transmission of chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil". *Emerging Infectious Diseases* **15**: 653; 2009.
- [23] PRATA, A. "Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease". *The Lancet Infectious Diseases* **1**: 92; 2001.
- [24] CHAGAS, C. "Tripanosomiase americana: forma aguda da molestia". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **8**: 37; 1916.

- [25] DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. "Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos". *Química Nova* **32**: 2444; 2009.
- [26] BARRETT, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASCH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. "The trypanosomiasis". *The Lancet* **362**: 1469; 2003.
- [27] PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÃO, M. A.; BENDIG, M. "Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery". *Nature Reviews Drug Discovery* **4**: 727; 2005.
- [28] COURA, J. R. "Present situation and new strategies for chagas disease chemotherapy - A proposal". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**: 549; 2009.
- [29] CAVALLI, A.; LIZZI, F.; BONGARZONE, S.; BELLUTI, F.; PIAZZI, L.; BOLOGNESI, M. L. "Complementary medicinal chemistry-driven strategies toward new antitrypanosomal and antileishmanial lead drug candidates". *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **58**: 51; 2009.
- [30] MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEON, W.; STOPPANI, A. O. M. "Different behaviors of benzimidazole as free radical generator with mammalian and Trypanosoma cruzi microsomal preparations". *Archives of Biochemistry and Biophysics* **218**: 585; 1982.
- [31] DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. "Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on Trypanosoma cruzi". *Reviews of Infectious Diseases* **6**: 223; 1984.
- [32] DE MACEDO, E. M. S.; WIGGERS, H. J.; SILVA, M. G. V.; BRAZ-FILHO, R.; ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. "A new bianthron glycoside as inhibitor of Trypanosoma cruzi glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity". *Journal of the Brazilian Chemical Society* **20**: 947; 2009.
- [33] VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. "Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs". *Drug Resistance Updates* **4**: 50; 2001.
- [34] BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOFF, H. V. "What controls glycolysis in bloodstream form Trypanosoma brucei?". *Journal of Biological Chemistry* **274**: 14551; 1999.
- [35] ENGEL, J. C.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. "Aerobic glucose fermentation by Trypanosoma cruzi axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes". *Molecular and Biochemical Parasitology* **26**: 1; 1987.
- [36] ARAKAKI, T. L.; BUCKNER, F. S.; GILLESPIE, J. R.; MALMQUIST, N. A.; PHILLIPS, M. A.; KALYUZHNIY, O.; LUFT, J. R.; DETITTA, G. T.; VERLINDE, C. L. M. J.; VAN VOORHIS, W. C.; HOL, W. G. J.; MERRITT, E. A. "Characterization of Trypanosoma brucei dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies". *Molecular Microbiology* **68**: 37; 2008.
- [37] CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. "Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas". *Química Nova* **32**: 175; 2009.
- [38] CHELESKI, J.; FREITAS, R. F.; WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; DE ARAÚJO, A. P. U.; MONTANARI, C. A. "Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi". *Protein Expression and Purification* **76**: 190; 2011.
- [39] KIM, H.; FEIL, I. K.; VERLINDE, C. L. M. J.; PETRA, P. H.; HOL, W. G. J. "Crystal Structure of Glycosomal Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from Leishmania mexicana: Implications for Structure-Based Drug Design and a New Position for the Inorganic Phosphate Binding Site". *Biochemistry* **34**: 14975; 1995.
- [40] GARRET, R. H. G., C.M. Glycolysis. In: GARRET, R. H. G., C.M., ed. *Biochemistry*. London; 1999: 609.
- [41] LEHNINGER, A. L. Glycolysis, gluconeogenesis, and the pentose phosphate pathway. In: NELSON, D. L. C., M.M., ed. *Lehninger: principles of biochemistry 4 ed.* New York; 2005: 521.
- [42] LADAME, S.; CASTILHO, M. S.; SILVA, C. H. T. P.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; PÉRIÉ, J.; OLIVA, G.; WILLSON, M. "Crystal structure of Trypanosoma cruzi glyceraldehyde-3-

phosphate dehydrogenase complexed with an analogue of 1,3-bisphospho-d-glyceric acid". *European Journal of Biochemistry* **270**: 4574; 2003.

[43] SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. "Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design". *FEBS Letters* **424**: 131; 1998.

[44] COPELAND, R. A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analyses*. New York: Wiley-VCH; 2000. 397p. p.

[45] WIGGERS, H. J. *Planejamento de inibidores da enzima glicerídeo-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi por biocalorimetria*. Instituto de Química - Universidade de São Paulo (USP), 2007. Dissertação de Mestrado, 102 p.

[46] ZOTTIS, A. *Planejamento Racional de Novos Agentes Quimioterápicos: Identificação e Estudos Cinéticos de Novos Inibidores da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase Glicossomal de Trypanosoma cruzi*. Instituto de Física - Universidade de São Paulo (USP), 2009. Tese de Doutorado, 141 p.

[47] COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. volume Unico; 2005: 296.

[48] COPELAND, R. A. Reversible Inhibitors. *Enzymes*: John Wiley & Sons, Inc.; 2002: 266.

[49] LEAVITT, S.; FREIRE, E. "Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry". *Current Opinion in Structural Biology* **11**: 560; 2001.

[50] ABABOU, A.; LADBURY, J. E. "Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry". *Journal of Molecular Recognition* **19**: 79; 2006.

[51] Disponível em: <http://www.microcal.com/documents/28987043AA.pdf> Acesso em: 13 de Julho de 2011

[52] TODD, M. J.; GOMEZ, J. "Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity?". *Analytical Biochemistry* **296**: 179; 2001.

[53] LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. "Sensing the heat: The application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions". *Chemistry and Biology* **3**: 791; 1996.

[54] FALCONER, R. J.; COLLINS, B. M. "Survey of the year 2009: applications of isothermal titration calorimetry". *Journal of Molecular Recognition* **24**: 1.

[55] GOLAN, D. E. Descoberta e Desenvolvimento Pré-clínicos de Fármacos. *Princípios de Farmacologia - A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia volume Unico*: Guanabara Koogan; 2007: 985.

[56] CLEMONS, P. A. A. *Cell-Based Assays for High-Throughput Screening: Methods and Protocols*. New York; 2009. p.

[57] Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html> Acesso em: 31/07

[58] CAVALIERI, D.; MCGOVERN, P.; HARTL, D.; MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. "Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine". *Journal of Molecular Evolution* **57**: S226; 2003.

[59] GUIMARÃES, T. M. *Isolamento, Identificação e Seleção de Cepas de Levedura Saccharomyces cerevisiae para Elaboração de Vinho*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFPR, 2005. Dissertação de Mestrado, 101 p.

[60] SHERMAN, F.; CHRISTINE, G.; GERALD, R. F. Getting started with yeast. *Methods in Enzymology, volume 350*: Academic Press; 2002: 3.

[61] NOOMNARM, U.; CLEGG, R. "Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations". *Photosynthesis Research* **101**: 181; 2009.

[62] Disponível em: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Tutorials.html> Acesso em: 31 de Julho

[63] CAO-HOANG, L.; MARECHAL, P.-A.; LÊ-THANH, M.; GERVAIS, P.; WACHÉ, Y. "Fluorescent probes to evaluate the physiological state and activity of microbial biocatalysts: A guide for prokaryotic and eukaryotic investigation". *Biotechnology Journal* **3**: 890; 2008.

[64] Disponível em: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07009.pdf> Acesso em: 24/07

- [65] MILLARD, P. J.; ROTH, B. L.; THI, H. P. T.; YUE, S. T.; HAUGLAND, R. P. "Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts". *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2897; 1997.
- [66] ESSARY, B. D.; MARSHALL, P. A. "Assessment of FUN-1 vital dye staining: Yeast with a block in the vacuolar sorting pathway have impaired ability to form CIVS when stained with FUN-1 fluorescent dye". *Journal of Microbiological Methods* **78**: 208; 2009.
- [67] EGGLESTON, M. D.; MARSHALL, P. A. "Saccharomyces cerevisiae samples stained with FUN-1 dye can be stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for later observation". *Journal of Microscopy* **225**: 100; 2007.
- [68] HUA, S.; BRANDL, M.; HERNLEM, B.; ENG, J.; SARREAL, S. "Fluorescent Viability Stains to Probe the Metabolic Status of Aflatoxigenic Fungus in Dual Culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*". *Mycopathologia* **171**: 133.
- [69] GUILLOU, S.; BESNARD, V.; EL MURR, N.; FEDERIGHI, M. "Viability of Saccharomyces cerevisiae cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content". *International Journal of Food Microbiology* **88**: 85; 2003.
- [70] VAN DER HEGGEN, M.; MARTINS, S.; FLORES, G.; SOARES, E. "Lead toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*". *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 1355; 2010.
- [71] CHELESKI, J.; FREITAS, R. F.; WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; DE ARAÚJO, A. P. U.; MONTANARI, C. A. "Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*". *Protein Expression and Purification* **76**: 190.
- [72] WIGGERS, H. J. *Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi por biocalorimetria*. Instituto de Química de São Carlos - USP, 2007. Dissertação de Mestrado, 86 p.
- [73] EDWARDS, P. M. "Origin 7.0: Scientific Graphing and Data Analysis Software". *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **42**: 1270; 2002.
- [74] MONTANARI, M. L. C. *Relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica baseadas em microcalorimetria biológica*. - Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. Tese de Doutorado, 217 p. p.
- [75] WIGGERS, H. J.; CHELESKI, J.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. "Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays". *Analytical Biochemistry* **370**: 107; 2007.
- [76] LEE, S. J. Typical and Atypical Enzyme Kinetics. In: LEE, S. J., ed. *Drug Metabolizing Enzymes - Cytochrome P450 and Other Enzymes in Drug Discovery and Development*; 2003: 211.
- [77] HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. "Ligand efficiency: a useful metric for lead selection". *Drug Discovery Today* **9**: 430; 2004.
- [78] SIEGAL, G.; AB, E.; SCHULTZ, J. "Integration of fragment screening and library design". *Drug Discovery Today* **12**: 1032; 2007.
- [79] CARR, R. A. E.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; REES, D. C. "Fragment-based lead discovery: leads by design". *Drug Discovery Today* **10**: 987; 2005.
- [80] LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings". *Advanced Drug Delivery Reviews* **23**: 3; 1997.
- [81] LEACH, A. R.; HANN, M. M.; BURROWS, J. N.; GRIFFEN, E. J. "Fragment screening: an introduction". *Molecular BioSystems* **2**: 429; 2006.
- [82] RESS, D. C.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; CARR, R. "Fragment-based lead discovery". *Nature Reviews Drug Discovery* **3**: 660; 2004.
- [83] KENNEDY, K. J.; BRESSI, J. C.; GELB, M. H. "A disubstituted NAD<sup>+</sup> analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase". *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **11**: 95; 2001.