

# **UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

## **Aplicação de Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor na Busca de Inibidores de Cisteíno-Proteases Parasitárias (cruzaína (*T. cruzi*) E CPB (leishmanioses))**

Drielli Gomes Vital Fujii

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo  
Abril de 2018

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Aplicação de Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor na Busca de  
Inibidores de Cisteíno-Proteases Parasitárias  
(cruzaína (*T. cruzi*) E CPB (leishmanioses))

Drielli Gomes Vital Fujii

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

São Paulo

Abril de 2018

Drielli Gomes Vital Fujii

Aplicação de Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor na Busca de  
Inibidores de Cisteíno-Proteases Parasitárias  
(cruzaína (*T. cruzi*) E CPB (leishmanioses))

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

---

1o. examinador

---

2o. examinador

---

3o. examinador

---

4o. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

V836a Vital-Fujii, Drielli  
Aplicação de Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor na Busca de Inibidores de Cisteíno-Proteases Parasitárias (cruzaína (T. cruzi) E CPB (leishmanioses)) / Drielli Vital-Fujii. - São Paulo, 2018.  
95 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.  
Orientador: Trossini, Gustavo

1. triagem virtual. 2. cisteíno-proteases. 3. doenças negligenciadas. 4. SBDD. I. T. II. Trossini, Gustavo, orientador.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que é a minha força e a minha fortaleza.

Aos meus pais, Luiz Gomes Vital e Ivone dos Santos Vital que são a minha base, os meus maiores exemplos de caráter e honestidade, obrigada por estarem sempre ao meu lado me apoiando e me dando forças para continuar.

Ao meu esposo, Marcell Luigi Fujii, por ser o meu maior exemplo de profissionalismo e dedicação, por ser companheiro, e estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus amigos Elys Juliane Cardoso Lima, Fernando de Moura Gatti e Glaucio Monteiro Ferreira por estarem ao meu lado sempre, me direcionando e me ajudando nos momentos difíceis, nas horas de estudo e de descontração.

Ao meu orientador, Professor Doutor Gustavo Henrique Goulart Trossini, por confiar no meu trabalho, por me passar suas experiências e ensinamentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF/USP) pela oportunidade.

À agência de fomento, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

À todos os colaboradores deste trabalho, sem eles o trabalho não estaria completo.

Aos professores da FCF/USP, que de uma maneira ou de outra contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus colegas de laboratório que me ajudaram durante este período, me ensinaram o que sabiam, e de uma forma especial, agradeço ao Prof. Dr. Vinícius Maltarollo que foi de grande ajuda no início deste trabalho e me passou muitos de seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Jair Lage de Siqueira-Neto que me acolheu na Universidade da Califórnia, San Diego durante meu estágio sanduíche, por todos os momentos de ensinamento profissional e pessoal.

*“A vontade de se preparar tem que ser maior do que  
a vontade de vencer”*

*(Bernardinho)*

## RESUMO

VITAL-FUJII, D. G. **Aplicação de planejamento baseado na estrutura do receptor na busca de inibidores de cisteíno-proteases parasitárias (cruzaína (*T. cruzi*) e CPB (leishmanioses))**. 2018. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Doenças causadas por agentes infecciosos e parasitários são chamadas negligenciadas por não despertarem interesse das indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. Essas doenças são responsáveis por levar milhões de pessoas à morte todos os anos e afetam principalmente os países pobres e em desenvolvimento. Dentre estas, a doença de Chagas e as leishmanioses, parasitoses causadas por parasitas flagelados pertencentes à família *Trypanosomatidae*, *T. cruzi* e *Leishmania* sp., respectivamente, se apresentam como um sério problema de saúde pública mundial. Endêmicas em vários países e causando milhões de mortes anualmente, ainda hoje não existem fármacos eficientes e seguros para o tratamento dessas doenças. Este panorama torna eminente a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para essas parasitoses. A busca por agentes quimioterápicos envolve a seleção de vias metabólicas essenciais à sobrevivência dos parasitas. Dentre estas, destacam-se cisteíno-proteases presentes nesses tripanossomatídeos, deste modo a cruzaína no *T. cruzi*, e a CPB2.8 na *Leishmania mexicana*, se mostram como alvos bioquímicos promissores. A disponibilidade de estruturas cristalográficas da cruzaína e do sequenciamento genômico da CPB2.8, nos permite utilizar estratégias de planejamento de fármacos baseado no receptor (*SBDD*) na identificação de candidatos a fármacos para essas doenças. Entre as técnicas modernas de *SBDD* utilizadas, a triagem virtual possibilita identificar promissores candidatos a novos fármacos. Assim neste trabalho, obteve-se por meio da técnica de modelagem comparativa o modelo da enzima CPB2.8 de *L. mexicana*, visto a indisponibilidade da estrutura cristalográfica no *Protein Data Bank* (PDB). De modo a refinar o modelo construído realizou-se a simulação por dinâmica molecular de 100ns, apresentando estabilização a partir de 80ns. A simulação por dinâmica molecular foi validada por meio do gráfico de Ramachandran, gráfico de raio de giro, RMSD, gráfico de superfície hidrofóbica. Foram calculados os mapas de interação molecular no programa *GRID* das seguintes proteínas: cruzaína, CPB2.8, catepsina B e catepsina L, e, posteriormente, foi construído um modelo farmacofórico baseado no sítio ativo das enzimas cruzaína e CPB2.8. O modelo farmacofórico da cruzaína foi validado por curva ROC apresentando valor de AUC 61%. A triagem virtual foi realizada para ambas as proteínas e foram obtidos 369 compostos para a cruzaína e 225 compostos para a CPB2.8. Foi realizado o ancoramento molecular desses compostos obtidos pela triagem virtual a fim de diminuir a quantidade de compostos a serem avaliados experimentalmente.

**Palavras-chaves:** Triagem virtual, cisteíno-proteases, doenças negligenciadas, *SBDD*, cruzaína, CPB2.8.

## ABSTRACT

VITAL-FUJII, D. G. **Structure-based virtual screening in the search of parasitic cysteine-proteases inhibitors**. 2018. 95f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Neglected diseases are caused by parasites and infectious agents and affect mainly people in poor areas being prevalent in 149 countries and causing 534,000 deaths per year. Among neglected diseases we can highlight Chagas Disease and Leishmaniasis, both have a high rate of morbidity and mortality and both are addressed in this project in the search of new drugs against a NTD. Nowadays, the search for new drugs involves the selection of biological pathways essential for parasite survival, in this class of parasites we can suggest the cysteine proteases, a proteases family present in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. In order to obtain a new agent against Neglected Disease in this work was obtained the model of the enzyme CPB2.8 of *L. mexicana* using the comparative modeling technique, due to the unavailability of the crystallographic structure in the Protein Data Bank (PDB). In order to refine the constructed model was performed the molecular dynamics simulation of 100ns, stabilization was achieved from 80ns. Molecular dynamics simulation was validated using the Ramachandran graph, radius of rotation graph, RMSD, hydrophobic surface area graph. The molecular interaction fields were calculated in the GRID program to cruzain, CPB2.8, cathepsin B and cathepsin L. Based on molecular interaction fields generated pharmacophoric models were constructed using information about the active site of the enzymes cruzain and CPB2.8. The pharmacophoric model of cruzain was validated by ROC curve presenting AUC value of 61%. Virtual screening was performed for both proteins and 369 compounds were obtained for cruzain and 225 compounds for CPB2.8. Docking studies of these compounds was performed in order to decrease the amount of compounds to be evaluated experimentally.

**Keywords:** Virtual Screening, Cysteine Proteases, Neglected Diseases, SBDD, cruzain, CPB2.8

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Doença de Chagas</b> .....	<b>13</b>
2.1.1 Quimioterapia.....	14
<b>2.2 Leishmanioses</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 Cisteíno-proteases</b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Cruzaína.....	20
2.3.2 CPB de Leishmania mexicana .....	24
<b>2.4 Planejamento de Fármacos</b> .....	<b>25</b>
<b>2.5 Química Computacional</b> .....	<b>26</b>
2.5.1 Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (Structure-Based Drug Design – SBDD) e Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Ligante (Ligand- Based Drug Design – LBDD) .....	27
2.5.2 Modelagem Comparativa.....	28
<b>2.6 Simulações por dinâmica molecular</b> .....	<b>29</b>
<b>3. OBJETIVOS e JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Materiais</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>35</b>
4.2.1 Modelagem Comparativa.....	35
4.2.2 Simulação por Dinâmica Molecular .....	36
4.2.3 Construção do Modelo Farmacofórico.....	37
4.2.4 Validação do Modelo Farmacofórico da enzima cruzaína de T. cruzi .....	38
4.2.5 Validação do Modelo Farmacofórico da enzima CPB2.8 de L. mexicana .....	39
4.2.6 Triagem virtual.....	40
4.2.6 Ancoramento Molecular .....	41
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>5.1 Modelagem Comparativa</b> .....	<b>42</b>
<b>5.2 Simulação por Dinâmica Molecular - Campo de Força AMBER99SB-ILDN</b> .....	<b>45</b>
<b>5.3 Modelos Farmacofóricos</b> .....	<b>53</b>
5.3.1 Modelo Farmacofórico CPB2.8 .....	53
5.3.2 Modelo Farmacofórico cruzaína .....	58
<b>5.4 Validação do modelo farmacofórico de cruzaína</b> .....	<b>61</b>
5.4.1 Construção da curva ROC para validação do modelo farmacofórico da enzima cruzaína.....	61
5.4.2 Validação do Modelo Farmacofórico da enzima CPB2.8 de L. mexicana .....	63
<b>5.5 Triagem Virtual</b> .....	<b>64</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>66</b>

<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>75</b>
<b>AI.1 REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO SANDUÍCHE .....</b>	<b>76</b>
<b>AI.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
<b>AI.2.1 Expressão da enzima cruzaina .....</b>	<b>77</b>
AI.2.1.1 Preparo do meio de expressão: extrato de levedura com peptone e dextrose .....	77
AI.2.1.2 Inóculo de <i>Pichia pastoris</i> .....	78
AI.2.1.3 Meio de Lise Celular .....	78
AI.2.1.4 Purificação da cruzaina .....	78
<b>AI.2.2 Ensaio de Inibição da cruzaina.....</b>	<b>79</b>
<b>AI.2.3 Ensaio de Inibição de Crescimento Parasitário .....</b>	<b>79</b>
<b>AI.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>AI.3.1 Ensaio de Inibição da cruzaina.....</b>	<b>81</b>
<b>AI.3.2 Ensaio Fenotípico .....</b>	<b>82</b>
<b>AI.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXO II .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO III .....</b>	<b>91</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O grupo de doenças tropicais e subtropicais causadas por agentes infecciosos e parasitários que afetam principalmente, os países em desenvolvimento e subdesenvolvimento são chamadas Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) (DNDi, 2018a; CDC, 2017; WHO, 2018a).

DTN são prevalentes em 149 países e afetam mais de um milhão de pessoas em todo o mundo. As populações mais pobres são afetadas devido à falta de saneamento básico e o contato direto com os vetores das doenças (DNDi, 2018a; CDC, 2017; WHO, 2018a).

Atualmente, 20 doenças fazem parte do grupo das DTN, dentre elas, Doença de Chagas, Leishmanioses, Dengue e Chikungunya e Tripanossomíase Americana, e são as principais causas de mortalidade e morbidade em todo o mundo (DNDi, 2018a; CDC, 2017; WHO, 2018a).

Apesar de essas doenças afetarem bilhões de pessoas, pouca ou quase nenhuma atenção tem sido dada por parte das indústrias farmacêuticas objetivando a eliminação ou controle epidemiológico das DTN (AERTS et al., 2017; DNDi, 2018a; PEDRIQUE et al., 2013; WHO, 2018a).

Prova disso é que somente 4% dos novos produtos introduzidos na terapêutica entre 2000 e 2011 foram direcionados a essas doenças e somente 4 de 336 novas entidades químicas foram aprovadas (PEDRIQUE et al., 2013).

Diante deste panorama, faz-se urgente a necessidade de novos fármacos para o tratamento das DTN. Nas últimas décadas, as pesquisas direcionadas à descoberta de novos fármacos passaram a buscar alvos macromoleculares específicos para doenças. Neste contexto, as enzimas são alvos de grande interesse, uma vez que desempenham papel fundamental em muitas doenças (COPELAND, 2013).

Dentre essas enzimas, a classe das cisteíno-proteases se destaca por terem importância para o ciclo de vida e a patogenicidade de alguns parasitas. Essas enzimas parasitárias desempenham diversas funções, entre elas imunoevasão, virulência, invasão celular e de tecidos (SAJID; McKERROW, 2002). Altamente expressadas em tripanossomatídeos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* sp., essas cisteíno-proteases, em sua maioria, são semelhantes à enzima humana, catepsina-L, diferenciando-se pela extensão C-terminal. O *T. cruzi* tem como principal cisteíno-protease a cruzipaina, e a *Leishmania* sp., a CPB (cisteíno-protease B)

(ALVES et al., 2001, McKERROW, 1999). Tendo em vista que essas enzimas são essenciais à sobrevivência dos parasitas causadores da doença de Chagas e também das Leishmanioses, se apresentam como alvos bioquímicos extremamente interessantes a serem utilizados na descoberta de novos fármacos contra essas endemias negligenciadas.

Um método bastante utilizado na identificação e otimização de inibidores enzimáticos é o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (*Structure Based Drug Design* - SBDD) (FERREIRA et al., 2014). Entre as técnicas modernas de SBDD, destacamos a triagem virtual, que possibilita identificar e selecionar candidatos a inibidores a partir de grandes bases de dados de compostos. Portanto, utilizando técnicas do planejamento de fármacos, é possível realizar estudos a fim de identificar novos inibidores que possam atuar nesses alvos se apresentando como novos candidatos a fármacos ou possíveis protótipos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Doença de Chagas

Em 1909, o médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro Chagas descobriu uma doença que acometia humanos, causada por um protozoário hemoflagelado, o qual denominou *Trypanosoma cruzi*, em homenagem ao seu companheiro de trabalho Oswaldo Cruz (NETO; PASTERNAK, 2009). Posteriormente, essa doença recebeu o nome de doença de Chagas, em homenagem a seu descobridor (URBINA, 2010).

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma endemia infecciosa causada pelo parasita hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009; DNDi, 2018b; PAHO, 2018a; WHO, 2018b). Endêmica em 21 países, estima-se que 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasita e que outros 70 milhões de indivíduos se encontrem sob risco de infecção. Segundo dados epidemiológicos, a doença apresenta 28.000 novos casos por ano, causando cerca de 12.000 mortes (DNDi, 2018b; PAHO, 2018a; WHO, 2018b).

A via de transmissão mais conhecida para essa doença é a vetorial, que se dá pela picada de insetos triatomíneos conhecidos como barbeiro. Outras vias de transmissão, apesar de menos frequentes, também são reportadas, tais como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão placentária, acidentes laboratoriais e alimentos contaminados (ANDREOLLO; MALAFAIA, 2009; DNDi, 2018b; PAHO, 2018a; WHO, 2018b).

A mudança no perfil epidemiológico da doença de Chagas teve grande influência dos processos migratórios da população, que se deslocou das zonas rurais para zonas urbanizadas. Quando a prevalência da doença era rural, relacionava-se o alto índice de contaminação à utilização de casas de taipa como moradia, o que propiciava o alojamento e a procriação dos insetos vetores. Com a chegada de pessoas infectadas às cidades, houve um espalhamento do número de infectados e o risco de transmissão pelas vias menos frequentes como transfusão sanguínea. Processos migratórios internacionais, promovidos em especial pela globalização, levaram focos da doença para outros continentes (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS, 2007; URBINA, 2010).

Com a mudança no perfil do doente, da transmissão e o alto índice de migração, a doença de Chagas, anteriormente considerada um problema da América Latina, hoje se encontra em países da Europa e na América do Norte, e se tornou um problema de saúde pública mundial (Figura 1) (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; DIAS, 2007; DNDi, 2018b).

Figura 1 – Mapa dos países com pessoas infectadas pela doença de Chagas



Fonte: DNDi, 2018b

### 2.1.1 Quimioterapia

Desde a descoberta da doença de Chagas, compostos de diversas classes químicas foram testados na tentativa de encontrar fármacos eficazes para a doença, porém nenhum demonstrou eficácia para promover a cura dos indivíduos infectados (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; COURA; CASTRO, 2002; URBINA, 2010).

A partir do ano de 1962, alguns agentes quimioterápicos se destacaram como agentes antichagásicos, dentre eles antibióticos e nitrofuranos (COURA; CASTRO, 2002). Ao avaliar biologicamente fármacos já testados contra o *T. cruzi*, Brener em 1968, concluiu que a maioria não era efetiva, porém verificou que os mesmos antibióticos e nitrofuranos apresentavam diminuição na parasitemia (COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; COURA; CASTRO, 2002).

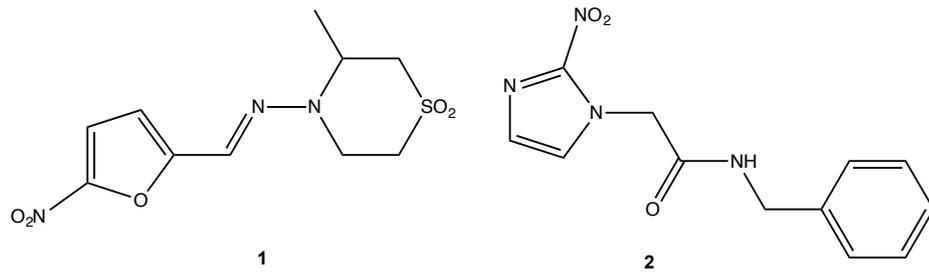
Entre os anos de 1952 e 1957, Packhanian em estudos com nitrofuranos descobriu que o composto nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona), quando administrado a camundongos infectados com *T. cruzi* na dose de 100 mg/ kg/

dia por 53 dias, causava a cura de mais de 90% desses animais (COURA; CASTRO, 2002; DIAS et al., 2009). Então, vários testes foram realizados em indivíduos infectados por *T. cruzi* que se encontravam na fase aguda da doença. Porém, na maioria dos casos, as pessoas apresentaram efeitos adversos graves e, alguns pacientes mesmo após o tratamento ainda mostravam sorologia positiva (COURA; CASTRO, 2002).

Uma série de derivados azóis já foram testados contra as formas do *T. cruzi*, incluindo o fármaco Posaconazol, que foi testado em modelo murino infectado com o parasita, inclusive em cepas resistentes ao benznidazol. O Posaconazol foi capaz de curar 80-90% dos animais infectados com cepas não-resistentes e 50% dos animais infectados com cepa resistente na fase aguda e em uma dosagem menor do que a utilizada com o benznidazol (MOLINA et al., 2000). Outro estudo demonstrou que a administração conjunta de benznidazol com posaconazol em doses menores que a usual leva a um aumento na taxa de sobrevivência dos animais (DINIZ et al., 2013).

Deste modo, os tratamentos utilizados contra a doença de Chagas ainda hoje se apresentam mais sintomáticos que etiológicos, buscando diminuir as manifestações da doença, principalmente os sintomas da insuficiência cardíaca congestiva (BUCKNER; URBINA, 2012; PEREIRA NUNES et al., 2013; URBINA, 2010). Do ponto de vista sintomático, procura-se amenizar as diversas manifestações da doença, por meio da administração de diuréticos para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva. Já do ponto de vista etiológico, somente dois fármacos são utilizados desde 1970, apesar de enormes esforços nas pesquisas de novos agentes antichagásicos, o nifurtimox e o benznidazol (Figura 2 – compostos 1 e 2, respectivamente), sendo que no Brasil o uso do nifurtimox foi descontinuado devido à toxicidade. Esses fármacos, apesar de diminuírem a parasitologia, causam graves efeitos adversos, atuam quase que exclusivamente na fase aguda e não são eficazes em todas as cepas do *T. cruzi*, não promovendo a cura da doença, o que demonstra a necessidade urgente da descoberta e desenvolvimento de novos antichagásicos (AGUIRRE et al., 2004; BUCKNER; URBINA, 2012; CLAYTON, 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2012; COURA, CASTRO, 2002; COURA, VIÑAS, 2010; DIAS, et al., 2009; GRAYSON, 2010; KOROKOLVAS, 2007; PEREIRA NUNES et al., 2013; URBINA, 2010).

Figura 2 – Estruturas químicas dos fármacos Nifurtimox (1) e Benznidazol (2)



Fonte: Desenhado pela autora

Recentemente, um avanço no que diz respeito ao tratamento da doença de Chagas foi realizado nos Estados Unidos, até o momento o país não tinha nenhum medicamento para o tratamento da doença de Chagas aprovado pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*). Então, em agosto de 2017, o medicamento benznidazol foi aprovado para o tratamento de pacientes entre 2 e 12 anos apresentando resultados negativos no teste de anticorpo, sendo que 60 e 55% dos pacientes apresentaram resultados negativos após o tratamento com benznidazol, durante dois ensaios clínicos, respectivamente (FDA, 2018).

Esse dados mostram que alguns esforços estão sendo realizados a fim de encontrar um tratamento eficaz para a doença de Chagas, mas ainda há muito o que se fazer para encontrar um novo candidato à fármaco para essa doença.

## 2.2 Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas causadas por um protozoário intracelular do gênero *Leishmania*, que afetam principalmente o sistema fagocítico mononuclear (SFM). Sua transmissão se dá por insetos flebotomíneos encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais (mais de 90 espécies são conhecidas). As fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* têm transmissão comprovada em seres humanos (DEN BOER et al., 2011; DNDi, 2018c; DOSTALOVÁ; VOLF, 2012; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; PAHO, 2016b; WHO, 2018c).

As leishmanioses apresentam características epidemiológicas e clínicas diferentes em cada área geográfica, por isso são consideradas doenças distintas estando reunidas em três grupos: leishmaniose cutânea (forma mais comum); leishmaniose muco cutânea ou cutaneomucosa; leishmaniose visceral ou calazar (forma mais grave) (DNDi, 2018c; PAHO, 2016b; REY, 2011; WHO, 2018c).

Há uma estimativa que 1 bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas, ocorrendo 300 mil novos casos de leishmaniose visceral anualmente com 20.000 mortes. E, nos últimos 5 anos, 1 milhão de casos de leishmaniose cutânea foram reportados (DNDi, 2018c; WHO, 2018c).

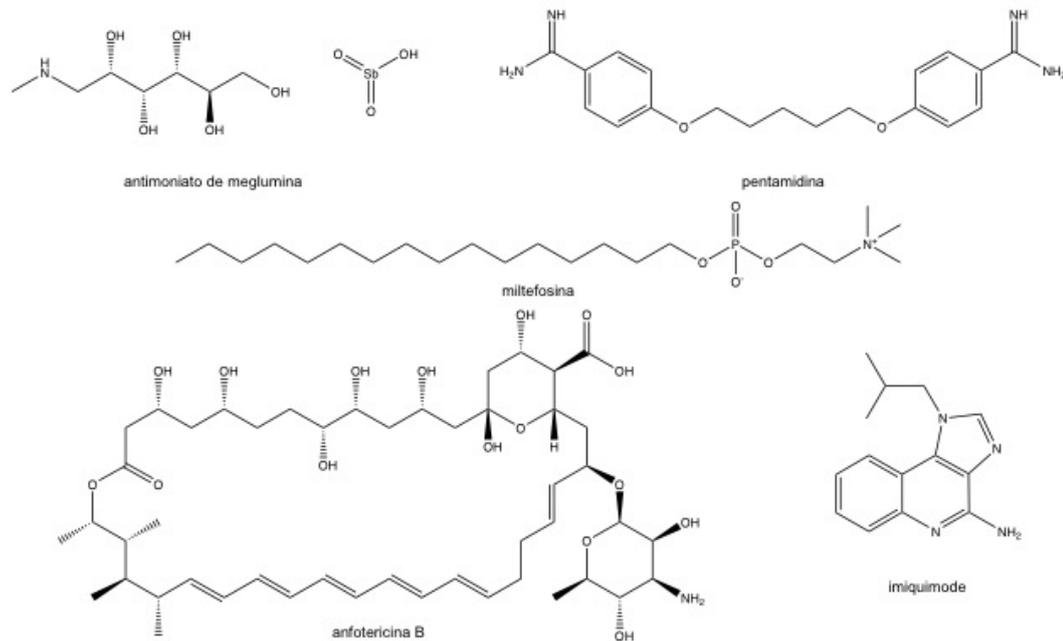
Na leishmaniose visceral ocorrem ataques irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado, anemia e pode ser fatal se não for tratada, podendo ocorrer co-infecção com outras doenças infecciosas. Em 2014, 90% dos novos casos reportados ocorreram principalmente em 6 países, são eles: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão, sendo altamente endêmica no leste de África e no subcontinente indiano (DNDi, 2018c; WHO, 2018c).

A forma mais comum da leishmaniose é a forma cutânea, responsável por causar lesões de pele que podem ser desfigurantes, e úlceras que podem deixar cicatrizes e/ou deficiências graves. Essas lesões podem se auto-curar em meses ou anos ou podem torna-se crônicas. Sua distribuição geográfica é bem ampla e 95% dos casos ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central (DNDi, 2018c; WHO, 2018c).

Na leishmaniose muco cutânea ocorre destruição, parcial ou total da mucosa da boca, nariz e garganta. Esse tipo de leishmaniose é principalmente encontrada na Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2018c).

O tratamento das leishmanioses depende de uma série de fatores, como por exemplo, o tipo da doença, a espécie do parasita, a localização geográfica (WHO, 2018c). Apesar do número de tratamentos ter aumentado na última década, ainda há muitos inconvenientes como dificuldade de administração, duração, toxicidade, custo e resistência dos parasitas frente ao medicamento (DNDi, 2018c). Os tratamentos mais utilizados são: antimoniais pentavalentes, pentamidinas, anfotericina B, miltefosina, imiquimode (Figura 3) (CROFT; OLLIARO, 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; REY, 2011).

Figura 3 – Estruturas químicas dos fármacos mais utilizados no tratamento das leishmanioses



Fonte: Desenhado pela autora

Com base no panorama acima descrito, é essencial a busca de novos fármacos que atuem contra a doença de Chagas e as leishmanioses e que não causem prejuízos à saúde e bem-estar dos pacientes.

Como já descrito, uma forma de estudo de novos fármacos que atuem nessas parasitologias é através de vias bioquímicas importantes para a sobrevivência do parasita (COPLAND, 2013).

Nos parasitas causadores da doença de Chagas e leishmanioses encontramos duas enzimas de extrema importância para a sobrevivência e também para a virulência dos mesmos, essas enzimas são chamadas cisteíno-proteases e discutiremos mais a seguir.

### 2.3 Cisteíno-proteases

Nas últimas décadas, as pesquisas direcionadas à descoberta de novos fármacos passaram a buscar alvos macromoleculares específicos para doenças. Neste contexto, as enzimas são alvos de grande interesse, uma vez que desempenham papel fundamental em muitas doenças (COPELAND, 2013).

A grande evolução nas áreas de biologia e genética possibilitou o sequenciamento genômico e a descoberta de diversos alvos bioquímicos em sistemas

biológicos. Dentre esses, a classe das cisteíno-proteases se destaca por ter importância para o ciclo de vida e a patogenicidade de alguns parasitas. Essas enzimas parasitárias desempenham diversas funções, entre elas imunoevasão, virulência, invasão celular e de tecidos (SAJID; McKERROW, 2002).

As cisteíno-proteases são divididas em duas famílias, denominadas Clan A (papaína-*like*) e Clan D (legumaina-*like*). A papaína foi a primeira cisteíno-protease a ser identificada e caracterizada. Depois de sua caracterização, diversas outras cisteíno-proteases foram identificadas e mostraram um sequenciamento semelhante ao da papaína; por esta razão foram denominadas “*papaína-like*”. A família CA, ou também chamada família “*papaína-like*”, foi dividida em vários grupos de acordo com as características de cada proteína, como semelhança de sequenciamento, especificidade bioquímica, tipo de substrato. A maioria das proteases parasitárias se encontra na família C1, assim como as catepsinas humana B e L (SAJID; McKERROW, 2002).

Altamente expressas em tripanossomatídeos como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania*, essas cisteíno-proteases, em sua maioria, são semelhantes à catepsina-L, diferenciando-se pela extensão C-terminal e diferenças principalmente no bolso S2 presente nessas enzimas (ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b; ALVES et al., 2001c; SAJID; McKERROW, 2002).

Apresentam um resíduo de cisteína (Cys) em seu sítio catalítico e hidrolisam proteínas por meio do ataque nucleofílico ao carbono carbonílico de uma ligação peptídica (McKERROW; ENGEL; CAFFREY, 1999; VERMELHO et al., 2010; SAJID; McKERROW, 2002).

As cisteíno-proteases escolhidas como alvo nesse trabalho são a cruzipapaína do *T. cruzi* e a CPB (cisteíno-protease B) de *Leishmania mexicana*. Tendo em vista que essas enzimas são essenciais à sobrevivência dos parasitas causadores da doença de Chagas e também das leishmanioses, as mesmas se apresentam como alvos bioquímicos extremamente interessantes a serem utilizados para a descoberta de novos fármacos contra essas endemias negligenciadas (ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b; ALVES et al., 2001c; SAJID; McKERROW, 2002).

### 2.3.1 Cruzaína

A cruzipaina (EC 3.4.22.51) é a mais importante cisteíno-protease presente no *T. cruzi*, pertence à superfamília de proteases parasitárias denominadas “*papaína-like*”. A enzima é biossintetizada pelo parasita e, em seguida, é clivada na porção N-terminal do pró-domínio para gerar a enzima madura. Essa enzima madura contém uma porção catalítica altamente semelhante à catepsina L (humana), que se situa no N-terminal (DEL NERY et al., 1997; GEA et al., 2006).

A cruzipaina também é conhecida como cruzaína; esta é a forma recombinante da enzima, a qual em estudos realizados por Alves em 2001a, apresentou aspectos cinéticos idênticos a enzima original do parasita. Como nos estudos realizados neste trabalho foi utilizada a forma recombinante, cruzaína, adotaremos esse nome no decorrer do texto.

A cruzaína é encontrada em todos os estágios evolutivos e cepas do *T. cruzi*, porém em localizações diferentes, desempenha funções específicas em cada estágio do parasita. Apresenta grande importância para a sobrevivência do parasita, principalmente, na entrada na célula do hospedeiro (GEA et al., 2006; SERVEAU et al., 1996; GILLMOR et al., 1997).

Outra função da cruzaína está ligada a produção do peptídeo pró-inflamatório Lys-bradicinina, a partir da proteólise do cininogênio, ou pela ativação da pré-caliceína plasmática, ativando a cascata da caliceína (CAZULLO; STOKA; TRUK, 2001; DEL NERY et al., 1997).

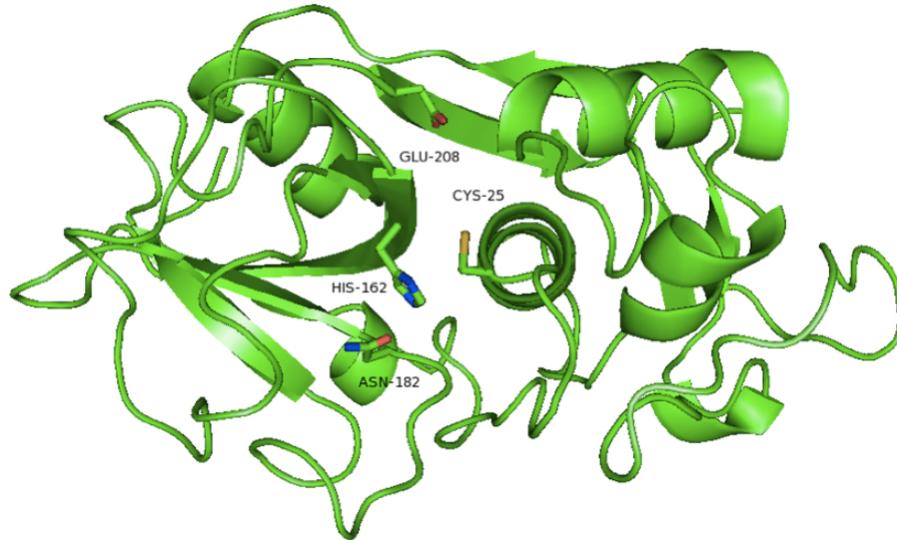
Nas formas epimastigotas, a enzima cruzaína se encontra em reservossomas (estruturas semelhantes aos lisossomas) e é altamente expressada; nas tripomastigotas, se encontra no bolso flagelar; e nas amastigotas intracelulares, está localizada na superfície da célula (GEA et al., 2006; SERVEAU et al., 1996; GILLMOR et al., 1997).

A cruzaína é uma glicoproteína monomérica, com peso molecular de 60 kDa, ativada por  $\beta$ -mercaptoetanol ou glutatona reduzida (CAZZULO et al., 1990; CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; DEL NERY et al., 1997; McGRATH et al., 1995).

Possui três sítios de glicosilação da asparagina, dois se encontram no domínio catalítico e um na porção do C-terminal, sendo que o sítio da porção C-terminal parece estar complexado com manose e oligossacarídeos (GEA et al., 2006). Sua tríade catalítica é preservada da família da papaína envolvendo os resíduos Cys25, His162

e Asn182; é composta por uma cadeia polipeptídica de 215 aminoácidos que ficam dentro de dois domínios constituídos por alfa-hélice e beta-folha. Entre os dois domínios, encontra-se uma fenda, na qual está localizado o sítio catalítico, contendo a tríade catalítica (Figura 4) (CAZZULO; STOKA; TURK, 2001; DEL NERY et al., 1997; McGRATH et al., 1995; SAJID et al., 2011).

Figura 4 – Estrutura cristalográfica da enzima cruzaina

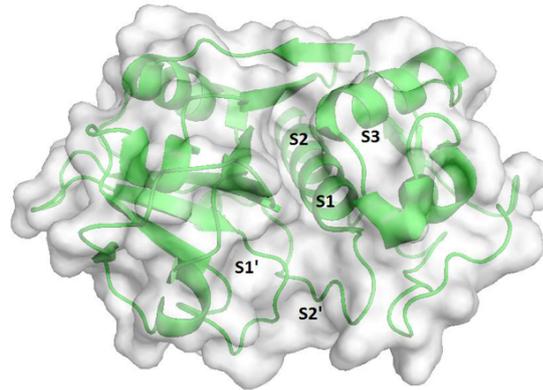


Fonte: estrutura cristalográfica da enzima cruzaina retirada do *pdb*: 3I06 adaptado pela autora. Legenda: Em verde a estrutura da enzima. Os resíduos da tríade catalítica Cys25, His162, Asn182 e resíduo Glu208 no bolso S2 em *stick*.

Por ser altamente expressa, há uma grande quantidade de isoformas da cruzaina, as quais apresentam massa molecular semelhante. Porém, estudos realizados com as isoformas Cz1 e Cz2 demonstraram que essas isoformas diferem quanto à preferência pelas características do substrato, exemplo, enquanto que a isoforma Cz1 aceita grupos hidrofóbicos e básicos na posição P1' do substrato, a isoforma Cz2 prefere grupos somente hidrofóbicos (dos REIS et al., 2006).

Em 2001, Alves e colaboradores (2001b), realizaram uma análise do subsítio S2 da cruzaina pois, como já descrito na literatura, esse subsítio é importante para a especificidade na enzima (Figura 5).

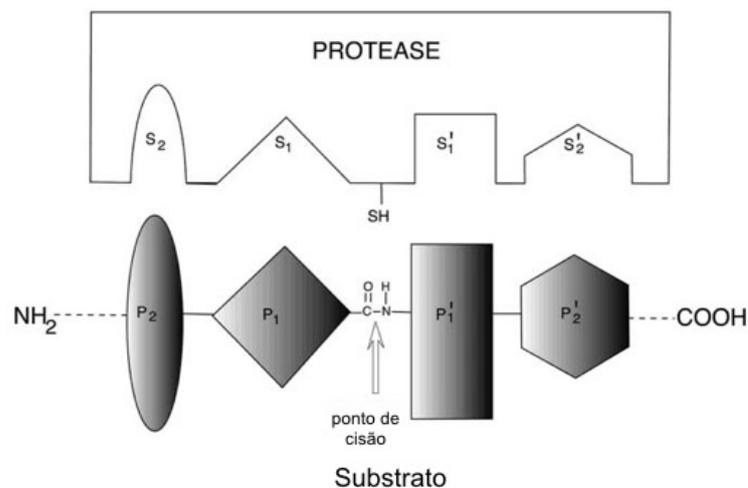
Figura 5 – Representação dos bolsos do sítio de interação da enzima cruzaina



Fonte: estrutura cristalográfica da enzima cruzaina retirada do *pdb*: 3I06 e 1ME4 adaptados pela autora. Em verde a estrutura da enzima em forma de cartoon; em branco a proteína mostrando a área de superfície de acesso ao solvente. As letras mostram os bolsos presentes no sítio de interação da proteína.

O subsítio S2 é capaz de fazer interação tanto com resíduos hidrofóbicos como com resíduos básicos na porção P2 do substrato ou do inibidor, devido à rotação do resíduo Glu208, presente no bolso S2 (Figura 4). Esse resíduo Glu208 é capaz de se orientar em direção ao substrato quando o mesmo possui um resíduo básico, ou em direção ao solvente quando o substrato possui um resíduo hidrofóbico (ALVES et al., 2001b). Já o subsítio S1 tem especificidade menos definida que o subsítio S2 e demonstrou preferência para substratos contendo grupos aromáticos e alifáticos com cadeia lateral curta, na porção P1 (Figura 6) (ALVES et al., 2001c).

Figura 6 – Representação da interação do substrato com a enzima cruzaina.



Fonte: Sajid; McKerrow, 2002. Em cinza o substrato com suas porções (P1, P2, P1' e P2') que interagem com os bolsos da proteína (em branco). No meio do substrato está o ponto de cisão entre os resíduos de aminoácidos que participarão da catálise e terão a ligação rompida pela ação do resíduo de cisteína (SH).

Jaishankar e colaboradores, (2008), a partir da técnica de modificação molecular, realizaram estudos de relação estrutura-atividade (SAR, *structure-activity relationships*) de compostos vinil-sulfônicos com atividade inibitória em cruzaina e rodesaina de *Trypanosoma brucei*. As informações obtidas pelo grupo foram de grande importância para o planejamento de novos inibidores uma vez que mostraram que substituições como adição de um grupamento metil na posição P3 do inibidor pode levar a uma diminuição de atividade frente a enzima cruzaina, mas aumento na atividade para a enzima rodesaina, mostrando que é possível um planejamento seletivo para uma das enzimas.

Problemas na biodisponibilidade oral de alguns inibidores levaram Du e colaboradores (2002) a sintetizar derivados de tiossemicarbonas alta potência: IC<sub>50</sub> entre 4 e 220 nM e propriedades farmacocinéticas compatíveis com a regra de Lipinski: massa molecular (242-298) ClogP (3,26-4,35), doadores de ligação hidrogênio (2-3), aceptores de ligação hidrogênio (3). Essa série de compostos apresentou atividade inibitória frente à cruzaina e atividade tripanocida (DU et al., 2002).

Para o planejamento de inibidores seletivos de cruzaina, técnicas modernas de planejamento de fármacos estão sendo utilizadas a fim de obter compostos mais ativos e menos tóxicos, utilizando a seletividade como fator crucial (JAISHANKAR et al., 2008). Entre as principais classes de compostos avaliados, as semi e tiossemicarbonas, chalconas, isatinas, hidroximetilcetonas, acil-hidrazidas, tiazolil-hidrazonas, vinil-sulfonas, aril-uréias, macrociclos e complexos metálicos têm apresentado atividade inibitória frente à cruzaina (AGUIRRE et al., 2004, 2006; BLAU et al., 2013; BORCHHARDT et al., 2009; BRAK et al., 2008; BRYANT et al., 2009; CARDOSO et al., 2014; CARVALHO et al., 2012; CHEN et al., 2008; DU et al., 2002; DUSCHAK; COUTO, 2007; ESPÍNDOLA et al., 2015; FONSECA et al., 2015; HERNANDES et al., 2010; JAISHANKAR et al., 2008; SERAFIM et al., 2014; SILES et al., 2006; TROSSINI et al., 2010; VITAL, ARRIBAS, TROSSINI, 2014).

O maior avanço na busca de inibidores seletivos da cruzaina foi a descoberta do composto K11777 que é uma vinil-sulfona. Foi descrito que a inibição da cruzaina por esse composto pode curar a infecção em camundongos com um tratamento de 20 a 30 dias (DOYLE et al., 2007; ENGEL et al., 1998). E um estudo realizado com cães infectados mostrou que a administração oral desse composto por 14 dias pode

proteger de danos cardíacos (BARR et al. 2005). Porém, os estudos clínicos em humanos foram interrompidos devido apresentar hepatotoxicidade.

### 2.3.2 CPB de *Leishmania mexicana*

Cisteíno-protease B (CPB – EC 3.4.22.B5) é uma protease encontrada nos parasitas de *Leishmania* e é descrita por ser uma “catepsina-L like”, pois apresenta a porção C-terminal comum nessa classe de enzimas (BERTI; STORER, 1995; COOMBS, 1982; COOMBS; MOTTRAM, 1997). É altamente expressa nas formas amastigotas que se encontram nos hospedeiros mamíferos, e em menor quantidade nas formas promastigotas que vivem nos mosquitos transmissores (COOMBS, 1982; MOTTRAM; BROOKS; COOMBS, 1998).

É expressada como uma enzima inativa, a qual possui uma pré-região contendo 18 aminoácidos que são retirados e dão origem a enzima madura que contém 219 aminoácidos incluindo a extensão C-terminal (COOMBS; MOTTRAM, 1997).

Essa classe de cisteíno-protease é encontrada como isoenzima que codifica um conjunto de 19 sequências de genes semelhantes conhecidos como CPB (cisteíno-protease classe B). São importantes para a sobrevivência do parasita no hospedeiro e para infecção, porém o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não foi esclarecido (MOTTRAM et al., 1992; ROBERTSON; COOMBS, 1990).

Um estudo realizado com enzimas nativas e mutantes, no qual os genes CPB foram retirados, mostrou que eles são importantes como fator de virulência. Após serem retirados os genes CPB, foi verificada a infectividade dos parasitas. Logo em seguida, uma única isoforma foi restaurada utilizando um gene com tamanho de 2.8 kb (denominado *Imcpb2.8*), o qual restaurou a infectividade dos parasitas em macrófagos (*in vitro*) de forma semelhante à enzima nativa (MOTTRAM et al., 1996). Outros estudos utilizando inibidores de CPB mostraram uma redução na infectividade dos parasitas tanto em macrófagos como em camundongos, sugerindo mais uma vez que a CPB é importante no fator de virulência dos parasitas de *Leishmania* (MOTTRAM et al., 1996; MOTTRAM et al., 1997).

Em 2000, Sanderson e colaboradores, expressaram e caracterizaram a forma recombinante da CPB2.8 sem a porção C-terminal (denominada CPB2.8 $\Delta$ CTE) a fim

de melhorar a produção e purificação da enzima e analisar o processo de modificação da enzima inativa para a enzima madura. Nesse estudo, a enzima recombinante mostrou-se 20 vezes mais ativa do que a enzima nativa e parâmetros como  $K_m$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_m$ , semelhantes ao da cruzaina de *T. cruzi*.

## 2.4 Planejamento de Fármacos

O planejamento de fármacos consiste em um processo complexo, dinâmico e integrado de métodos experimentais e computacionais, visando à identificação e desenvolvimento de moléculas biologicamente ativas (CERQUEIRA et al., 2015; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2014; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009; SANT'ANNA, 2002).

Para o planejamento de fármacos, além do conhecimento profundo da doença e das vias bioquímicas envolvidas, são necessários também estudos de farmacocinética e toxicidade dos compostos estudados, exigindo interdisciplinaridade e conhecimento em várias áreas de estudo (CERQUEIRA et al., 2015; IUPAC, 2006; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009; SANT'ANNA, 2002).

Baseada nas bases moleculares da terapêutica, essa estratégia utiliza modernas ferramentas estruturais, farmacológicas ou químicas, bancos de dados contendo compostos reais ou virtuais, estruturas tridimensionais (3D) dos alvos bioquímicos, química computacional, entre outros para alcançar o objetivo principal: encontrar um fármaco que encaixe de forma específica no alvo de interesse (BARREIRO; FRAGA, 2008; CERQUEIRA et al., 2015; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2014; IUPAC, 2006; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009).

Podendo ser realizado com base na estrutura do ligante ou do receptor, o planejamento de fármacos é utilizado na obtenção de compostos que tenham um efeito biológico esperado devido seu desenvolvimento “sob medida”. (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2012; HOPFINGER, 1985; KRÜGER; EVERS, 2010; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009).

Dentre as ferramentas utilizadas para o planejamento de fármacos, tem-se o Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computadores ou CADD (*Computer-Assisted Drug Design*), no qual é possível a partir de técnicas computacionais,

planejar e otimizar compostos bioativos de forma a melhorar a estrutura do fármaco, melhorar biodisponibilidade e biotransformação, diminuir toxicidade, a fim de obter um novo candidato à fármaco ou melhorar as propriedades de um fármaco já existente (IUPAC, 2006; MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009; SANT'ANNA, 2002).

## 2.5 Química Computacional

Química computacional é composta por um conjunto de técnicas que utilizam métodos computacionais na resolução de problemas químicos (GASTEIGER, 2006a; IUPAC, 2006). Por meio de recursos matemáticos, utilizando métodos de mecânica clássica, física quântica, e química teórica para simular situações próximas do real, sob determinadas condições (GASTEIGER, 2006a, b; IUPAC, 2006; OLSSON; OPREA, 2001). Os métodos realizados utilizam cálculos para o processamento, visualização e análise de resultados na busca de moléculas bioativas e/ou no entendimento de seu mecanismo de ação (GASTEIGER, 2006a, b; IUPAC, 2006; OLSSON; OPREA, 2001).

A partir da década de 1980, houveram avanços no desenvolvimento e melhoria nos *softwares* e *hardwares*, juntamente com avanços no conhecimento bioquímico sobre as bases moleculares das doenças, o que permitiu um avanço significativo na química computacional aplicada ao planejamento de fármacos permitindo a utilização desta tecnologia na academia e nas indústrias químicas e farmacêuticas (CERQUEIRA et al., 2015; GASTEIGER, 2006a, b; ITAI et al., 1996; WERMUTH, 2008).

Dentre tantos métodos possíveis de realizar com a química computacional, a triagem virtual é amplamente utilizada e tem como objetivo encontrar e selecionar compostos que apresentem propriedades desejadas para atingir o alvo em estudo (CERQUEIRA et al., 2015).

### 2.5.1 Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (Structure-Based Drug Design – SBDD) e Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Ligante (Ligand- Based Drug Design – LBDD)

A integração de técnicas computacionais e experimentais é cada vez mais utilizada no planejamento e desenvolvimento de moléculas bioativas candidatas a fármacos. Assim, estratégias como planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD – Structure-Based Drug Design) e planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD - Ligand-Based Drug Design) ganham destaque (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2014; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; MACALINO et al., 2015).

O LBDD utiliza um conjunto de moléculas com propriedades e características diversas e que apresentam potência conhecida para o alvo em estudo, e são usadas a fim de identificar um novo composto ativo, otimizar um composto já existente, estabelecer relação entre a estrutura química e a atividade biológica, entre outros (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; MACALINO et al., 2015).

Em estudos de SBDD é necessário a avaliação detalhada do alvo biológico. Para isso, utiliza-se informações obtidas por meio da cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear (RMN) ou modelagem comparativa (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2014; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010; MACALINO et al., 2015).

A estratégia de SBDD vem sendo amplamente aplicada na busca de inibidores da cruzaina, na tentativa de encontrar novos agentes contra o *T. cruzi* para a doença de Chagas, visto a disponibilidade de estruturas cristalográficas desta enzima com qualidade suficiente para aplicação desta técnica (FERREIRA et al., 2014; GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2012; TROSSINI, 2008). No entanto, para a *L. mexicana*, a estrutura cristalográfica da enzima CPB2.8 ainda não está disponível, sendo necessária a aplicação de técnicas de modelagem comparativa e simulação de dinâmica molecular.

#### 2.5.1.1 Triagem virtual (virtual screening): LBVS e SBVS

A triagem virtual é um método computacional que usa a estrutura do alvo ou do ligante para determinar o reconhecimento e a interação ligante-receptor, e tem como

objetivo identificar pequenas moléculas com características desejáveis para a atividade biológica. Essa metodologia pode ser realizada com base na estrutura do ligante (LBVS – Ligand- Based Virtual Screening) ou com base na estrutura do alvo biológico (SBVS – Structure-Based Virtual Screening) por meio da análise estrutural, complementariedade química e/ou farmacofórica (CERQUEIRA et al., 2015; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2014; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

O LBVS busca identificar compostos que apresentem semelhanças físicas e químicas, baseando-se no princípio de que moléculas semelhantes terão efeitos semelhantes no alvo desejado (CERQUEIRA et al., 2015).

Já no SBVS, primeiramente seleciona-se um alvo bioquímico, e após, organiza-se bancos de dados virtuais de compostos que contemplem uma grande diversidade química (ex. ZINC, eMolecules e ChemDiv). Como esses bancos de dados são compostos por milhares de compostos, a triagem virtual é guiada por filtros moleculares, tais como modelos farmacofóricos e propriedades físico-químicas. A regra dos cinco descrita por Lipinski e colaboradores, 1998 (peso molecular >500, doadores de ligação de hidrogênio >5, aceptores de ligação de hidrogênio >10 e clogP >5), é um excelente exemplo de filtro molecular utilizado. Em seguida, realiza-se o docking molecular das estruturas previamente selecionadas pelos filtros estabelecidos, de modo a avaliar a complementariedade com o alvo. A última etapa, e mais importante é a seleção de compostos promissores e o teste biológico na enzima alvo. Essa etapa mostra experimentalmente a atividade dos compostos selecionados, validando todo o processo realizado (CERQUEIRA et al., 2015; FERREIRA; ANDRICOPULO, 2014; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

### 2.5.2 Modelagem Comparativa

A técnica computacional de modelagem comparativa tem como finalidade a obtenção da estrutura 3D de uma proteína alvo, por meio da comparação da sequência genética de aminoácidos desta proteína com o de uma proteína de estrutura 3D conhecida, a qual é utilizada como molde. Ou seja, são utilizadas informações estruturais já determinadas experimentalmente na construção de modelos (GRANT, 2009; HÖLTJE et al., 2008; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; SHEN; BAX, 2015).

O alinhamento obtido entre as duas sequências é realizado por meio de uma função de pontuação de alinhamento, na qual tem-se uma matriz de pontuação para cada resíduo presente no molde e substituído ou mantido na sequência do banco de dados, e uma função de penalidade é utilizada. Quando a pontuação de alinhamento é gerada, procura-se a melhor sequência de alinhamento no banco de dados (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; SHEN; BAX, 2015).

O processo de modelagem de proteínas ocorre em quatro partes: encontrar uma sequência similar para ser usada como modelo, fazer o alinhamento da sequência molde com o modelo e, por fim, construir e avaliar o modelo (BAKER; SALI, 2001; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014).

A utilização desta técnica no desenvolvimento de fármacos exige acurácia e avaliação da qualidade do modelo estrutural e dos métodos utilizados (BAKER; SALI, 2001; GRANT, 2009; HÖLTJE et al., 2008; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014). A acurácia é descrita pela porcentagem de similaridade entre a sequência do molde com o modelo, e deve ser maior que 50% (BAKER; SALI, 2001; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014).

Devido às várias estruturas cristalográficas de cisteíno-proteases, *papain-like*, disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) com alta resolução, dentre elas catepsinas e cruzaina, e sabendo não estar disponível até o momento estruturas cristalográficas da CPB2.8 (*L. mexicana*), a técnica de modelagem comparativa foi utilizada neste trabalho e se apresentou como uma excelente ferramenta na construção de modelos para esse alvo, que será aplicado em SBDD.

## 2.6 Simulações por dinâmica molecular

A simulação por dinâmica molecular (DM) é uma das principais ferramentas computacionais criada para o estudo do movimento de sistemas, proteínas e de outros biopolímeros, ao longo do tempo (HANSSON; OOSTENBRINK; van GUNSTEREN, 2002; MARTÍNEZ; BORIN; SKAF, 2007). Sendo utilizada, até mesmo como complemento de técnicas experimentais, visto que por meio desta pode-se obter informação microscópica de uma observação em caráter experimental (HANSSON; OOSTENBRINK; van GUNSTEREN, 2002; MARTÍNEZ; BORIN; SKAF, 2007).

Na DM, podemos obter informações a respeito de mudanças conformacionais e funcionamento dos sistemas, diferenças de energia livre no processo de ligação de um ligante no sítio ativo, entre outros (HANSSON; OOSTENBRINK; van GUNSTEREN, 2002; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; SALSBURY, 2010).

Na DM clássica, baseada na mecânica molecular, os átomos são considerados como bolas enquanto que as ligações são vistas como molas que podem oscilar de acordo com uma distância ótima (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; NAMBA; da SILVA; da SILVA, 2008; SALSBURY, 2010). Nenhum efeito quântico é considerado na DM clássica; isso quer dizer que nenhuma ligação química é rompida e não ocorre nenhum efeito de ressonância. Os potenciais utilizados são baseados em aproximações (MARTÍNEZ; BORIN; SKAF, 2007;).

Tais aproximações são realizadas para simular um movimento real dos átomos e são baseadas na Lei de Movimento de Newton (Equação 1), que consiste numa solução numérica, passo a passo, da equação de movimento de Newton (DURRANT; McCAMMON, 2011; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; MARTÍNEZ; BORIN; SKAF, 2007; NAMBA; da SILVA; da SILVA, 2008):

$$F_i(t) = m_i a_i \quad (1)$$

onde:

- $F_i$  é a força exercida em cada átomo no tempo  $t$ ;
- $m_i$  é a massa do átomo;
- $a_i$  é a aceleração.

A lei de movimento de Newton permite um estudo das configurações do sistema através do tempo, onde se conhece o tempo e a posição inicial de uma dada partícula, é possível calcular, através das equações Newtonianas, a posição e o tempo posterior dessa mesma partícula. E a cada posição gerada, obtêm-se um novo movimento, resultando em uma trajetória que descreve as posições e velocidades das partículas do sistema nas diferentes variações de tempo (LEACH, 2001; MARTÍNEZ; BORIN; SKAF, 2007).

As forças que agem em cada átomo do sistema podem ser obtidas a partir da equação 2 (abaixo). Essas forças são provenientes da contribuição das interações entre os átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e não

ligados (interações de van der Waals, e de Coulomb) (DURRANT; McCAMMON, 2011; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; MARTÍNEZ; BORIN; SKAF, 2007; NAMBA; da SILVA; da SILVA, 2008).

$$E_{\text{total}} = \sum E_{\text{est}} + \sum E_{\text{ang}} + \sum E_{\text{vdW}} + \sum E_{1,4} + \sum E_{\text{elet}} + \sum E_{\text{tors}} \quad (2)$$

onde:

- $E_{\text{total}}$  é a soma dos termos de energia (ligados e não ligados);
- $E_{\text{est}}$  é energia de estiramento da ligação em relação ao valor de equilíbrio;
- $E_{\text{ang}}$  representa a energia de deformação angular;
- $E_{\text{vdW}}$  representa a energia das interações de van der Waals;
- $E_{1,4}$  representa a energia de interações não ligadas do tipo 1-4;
- $E_{\text{elet}}$  é a energia de atração ou repulsão entre duas cargas eletrostáticas (lei de Coulomb);
- $E_{\text{tors}}$  corresponde à deformação torsional.

O conjunto das interações que descrevem as contribuições das forças de cada átomo do sistema que governam a DM é chamado campo de força, e este permite que a energia potencial do sistema como um todo seja calculada (Equação 2). A escolha do campo de força depende do sistema a ser estudado e dos parâmetros a serem pesquisados. Há vários tipos de campos de força disponíveis, os mais utilizados são: CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics – MacKERELL et al., 1998); AMBER (Assisted Model Building and Energy Refinement – CORNELL et al., 1995); OPLS (Optimized Potential for Liquid Simulations – JORGENSEN; MAXWELL; TIRADO-RIVES, 1996); GROMOS (GRONingen MOlecular Simulation – van GUNSTEREN et al., 1996) (DURRANT; McCAMMON, 2011; KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; NAMBA; da SILVA; da SILVA, 2008).

Após a escolha do campo de força, é possível calcular a força que age sobre cada átomo a partir da derivada da energia potencial ( $V$ ) obtida do campo de força em relação às posições dos átomos ( $r$ ) (equação 3). Esta equação gera a aceleração da partícula.

$$F_i(t) = - \frac{\delta V(r)}{\delta \vec{r}_i} \quad (3)$$

Como a equação 1 gera somente a aceleração, integra-se as equações (1 e 3), dessa forma, é possível obter as velocidades, que por sua vez, integradas, geram as mudanças nas posições dos átomos (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014; NAMBA; da SILVA; da SILVA, 2008). A partir das posições e velocidades obtidas de cada átomo, é possível calcular a energia potencial e a cinética do sistema. Quando esse processo acima é aplicado consecutivamente, obtêm-se o conjunto de posições e velocidades de cada átomo ao longo do tempo, que é denominado trajetória (NAMBA; da SILVA; da SILVA, 2008).

### 3. OBJETIVOS e JUSTIFICATIVA

Devido à escassez de alternativas quimioterápicas contra a doença de Chagas e as leishmanioses e o que foi exposto no tópico de revisão bibliográfica deste trabalho, é urgente a necessidade de novos fármacos contra essas parasitoses. As enzimas cisteíno-proteases, cruzaina do *T. cruzi* e CPB2.8 de *Leishmania mexicana* são alvos moleculares interessantes na busca de novos agentes contra esses tripanossomatídeos, uma vez que são essenciais para o desenvolvimento e sobrevivência dos parasitas e, também atuam nos processos de invasão celular e modificação da resposta imune do hospedeiro (ALVES et al., 2001a; COPELAND, 2013; SAJID et al., 2011; SAJID; McKERROW, 2002).

O planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (*Structure Based Drug Design* - SBDD) é um método utilizado para auxiliar a identificação de compostos promissores candidatos à novos fármacos (FERREIRA et al., 2014). Uma das ferramentas de SBDD muito utilizadas, inclusive neste trabalho é a triagem virtual, que possibilita identificar e selecionar candidatos a inibidores, a partir de grandes bases de dados de compostos.

Visto a disponibilidade da estrutura cristalográfica da cruzaina em excelente resolução, esta pode ser utilizada na aplicação do método de SBDD na seleção de uma nova série de candidatos a antichagásicos (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011; GRANT, 2009).

Por outro lado, apesar da estrutura cristalográfica da CPB2.8 de *L. mexicana* não estar disponível, são conhecidos seus parâmetros cinéticos e sua sequência de aminoácidos, que apresenta alta identidade com as outras proteínas *papaína-like*, permitindo a aplicação do SBDD por meio de modelagem comparativa e posterior triagem virtual.

Com o objetivo de obter novos agentes quimioterápicos, tripanomicidas e leishmanicidas, o presente trabalho teve como objetivo principal a utilização de técnicas modernas de triagem virtual e SBDD, na busca de novos compostos tripanossomatídeos que atuem como inibidores das cisteíno-proteases cruzaina e CPB2.8. Para isso, o trabalho apresentou como objetivos específicos:

- Construção do modelo da CPB de *L. mexicana* por meio de modelagem comparativa;

- Simulação e refinamento por dinâmica molecular do modelo obtido por modelagem comparativa;
- Análise do sítio ativo das proteases por campos de interação molecular;
- Construção de farmacóforos para proteases de *L. mexicana* e *T. cruzi*;
- Busca virtual de compostos tripanossomatídeos;
- Seleção dos compostos para posterior avaliação biológica.

A integração entre estratégias teóricas (computacionais) e experimentais (avaliação biológica), fundamental para o planejamento e obtenção de novos fármacos e claramente refletida neste trabalho, é de grande valia dentro do paradigma da Química Farmacêutica e Medicinal Moderna, seguindo tendências científicas e tecnológicas atuais nos aspectos multi e interdisciplinares. Espera-se, dessa forma, contribuir para a quimioterapia da doença de Chagas e leishmanioses, doenças consideradas extremamente negligenciadas, que necessitam de atenção, especialmente, nos países acometidos.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

- ✓ Computadores e Estações de Trabalho:
  - Workstations HP Z600 (Xeon X5650, HD 1Tb, NVIDIA Quadro 4000 1Gb);
  - Computadores PC/Windows
  - Linux
  
- ✓ Softwares:
  - PyMOL v1.6;
  - Sybyl-X v2.1.1;
  - GRID v1.2.2;
  - Excel v14.6.7;
  - GOLD v5.5;
  - Hermes v1.8.2;
  - GraphPad Prism v7b (Trial License);
  - MarvinSketch v16.5.16.0.
  - Gromacs v4.5.6
  - Ômega v3.0.0.1

### 4.2 Métodos

#### 4.2.1 Modelagem Comparativa

Primeiramente, foi realizada uma busca da sequência de aminoácidos da CPB2.8 no banco de dados NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/)), utilizando a palavra-chave *lmcpb2.8*.

A partir da sequência de aminoácidos da CPB2.8 de *L. mexicana*, foi realizada uma busca por proteínas com identidade estrutural no servidor HHpred

(<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) que faz busca e detecção de homologia e similaridade e predição de estrutura por meio de algoritmos baseados em alinhamentos HMM-HMM (Hidden Markov Models – Modelos ocultos de Markov) (SÖDING; BIEGERT; LUPAS, 2005).

Foi realizado um alinhamento global, que é feito ao longo de toda a sequência, de um extremo ao outro, a fim de se determinar as regiões mais conservadas e que apresentam alto grau de similaridade (MUNIZ, 2003).

Após a etapa de alinhamento, foi realizada a escolha por um molde apropriado, levando-se em consideração a identidade de sequência, que diz a porcentagem de semelhança entre a proteína molde e o modelo; a porcentagem de probabilidade (probabilidade de uma sequência aleatória com mesmo tamanho e composição obter o mesmo *score*), o *E-value* (indica o número de alinhamentos diferentes com valores de *score* iguais ou melhores que a pontuação e que sejam encontrados por uma busca por acaso) e a pontuação (pontuação de alinhamento). O melhor alinhamento foi obtido com a estrutura cristalográfica da enzima cruzaina de *T. cruzi* (pdb: 3I06). A qualidade da estrutura cristalográfica também foi verificada a partir dos valores de resolução (capacidade de visualizar que dois átomos são diferentes em uma menor distância possível), *R-free value* (compara quanto o modelo de difração de raio-x é semelhante ao dado experimental, valores próximos ao zero são ideais), gráfico de Ramachandran (identifica a partir da correlação entre os ângulos  $\phi$  (phi) e  $\psi$  (psi) quais resíduos contribuem para a conformação da proteína e quais se encontram fora das regiões energeticamente favoráveis) e o fator B (descreve o deslocamento das regiões atômicas, valores geralmente entre 15-30 Å são mais aceitáveis, porém áreas muito flexíveis podem apresentar valores maiores). A partir destes resultados, foi realizada a construção do modelo da estrutura da CPB2.8 empregando o programa Modeller (SALI et al., 1995).

Na etapa de validação do modelo utilizou-se o gráfico de Ramachandran e análise visual através da sobreposição do modelo com a estrutura da cruzaina (pdb: 3I06), e seguiu-se as etapas de validação descritas no servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>).

#### 4.2.2 Simulação por Dinâmica Molecular

A simulação por dinâmica molecular foi realizada utilizando o campo de força AMBER99SB-ILDN no programa Gromacs v4.5.6.

A solvatação do sistema foi considerada explícita, na qual moléculas de água foram representadas pelo modelo TIP3P, os íons foram adicionados para neutralizar a carga do sistema a uma concentração fisiológica (NaCl a 0,1 M), e a protonação dos resíduos foi ajustada ao pH 5,5 (pH do ensaio biológico descrito em Ferreira et al., 2010). Foram mantidas temperatura e pressão constantes, em uma caixa cúbica periódica. Inicialmente, foi realizado um cálculo de minimização seguido de equilíbrio do sistema e, por fim, a simulação com o sistema livre foi realizada por 100 ns.

#### 4.2.3 Construção do Modelo Farmacofórico

A partir da estrutura do modelo obtido após a DM (CPB2.8) e a estrutura cristalográfica das enzimas cruzaina (*pdb*: 3I06 – resolução 1,1 Å), catepsina L (*pdb*: 2XU3 - resolução 0,90 Å) e catepsina B (*pdb*: 1GMY - resolução 1,9 Å), os cálculos dos campos de interação molecular (*MIFs*) foram realizados para cada uma das estruturas no programa *GRID* v1.2.2, utilizando as seguintes sondas químicas:

- ✓ H<sub>2</sub>O – Hidrofílica
- ✓ Dry – Hidrofóbica
- ✓ C1 - Carbono vinílico e/ou aromático
- ✓ C3 - Carbono sp<sup>3</sup>
- ✓ N: - Nitrogênio aceptor de ligação de hidrogênio
- ✓ N1 – Nitrogênio doador de ligação de hidrogênio
- ✓ O – Oxigênio sp<sup>2</sup> (aceptor de ligação de hidrogênio)
- ✓ COO<sup>-</sup> – Carboxilato alifático
- ✓ Ar. COO<sup>-</sup> – Carboxilato aromático
- ✓ CONH<sub>2</sub> – Amida alifática
- ✓ Ar. CONH<sub>2</sub> – Amida aromática

A caixa *GRID* foi centralizada no resíduo de Cys25, que é o principal resíduo catalítico da proteína, e suas coordenadas foram definidas no eixo x, y e z.

Foram calculados os *MIFs* para todas as estruturas alinhadas, para avaliar se havia alguma variação nos campos gerados. Os campos de interação molecular foram visualizados e tratados no programa PyMOL v1.6. Foram geradas imagens de cada estrutura com suas respectivas sondas.

Após esse processo, foi realizada uma comparação entre as estruturas a fim de verificar pontos que não fossem comuns a fim de construir um modelo farmacofórico mais seletivo. A comparação foi realizada entre as estruturas da CPB2.8 e catepsina L e B; e entre a cruzaina e as mesmas catepsinas. Posteriormente, comparou-se a cruzaina com a CPB 2.8 e foram obtidos os resíduos predominantes para a construção dos respectivos farmacóforos.

#### 4.2.4 Validação do Modelo Farmacofórico da enzima cruzaina de *T. cruzi*

Devido a dificuldade na validação do modelo farmacofórico inicial, outros dez modelos foram construídos para a enzima cruzaina, foram analisados os campos de interação molecular e foram comparados com as enzimas humanas a fim de encontrar campos que não estivessem nas enzimas humanas buscando assim um ponto seletivo, como descrito no tópico anterior.

Dentre os dez modelos farmacofóricos construídos, apenas um apresentou condição e qualidade suficiente para ser validado com valor de AUC (área sob a curva) acima de 60% (HEVENER et al., 2009).

Após a construção e análise do modelo farmacofórico no programa PyMOL v1.6, os pontos de interação obtidos foram construídos no programa Sybyl-X v2.1.1 no módulo UNITY a fim de realizar a validação.

Primeiramente, buscou-se no ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>), que é um banco de dados de moléculas bioativas, compostos que já foram testados contra a enzima cruzaina (BENTO et al., 2014). Após a obtenção desse banco de dados, foi realizada uma análise sobre o tipo de ensaio realizado, de forma que todos os compostos ativos selecionados tenham sido testados contra a enzima utilizando os mesmos parâmetros de ensaio que serão utilizados para posterior avaliação das moléculas obtidas neste trabalho, a fim de se evitar erros.

Para a seleção dos compostos bioativos, levou-se em consideração os compostos que apresentaram valores de  $IC_{50}$  para a enzima menores que 10  $\mu$ M.

Esses compostos foram separados e no programa MarvinSketch v16.5.16.0 foram passados para formato smiles, processo necessário para o próximo passo.

A lista no formato smiles foi utilizada para obtenção de *decoys* (compostos falso-positivos) no banco de dados DUD-e (HUANG; SHOICHET; IRWIN, 2006; MYSINGER, 2012). Um banco de dados de *decoys* e outro de compostos ativos foi gerado no programa Sybyl-X v2.1.1 no módulo UNITY. Esses bancos de dados (*decoys* e ativos) foram utilizados para a busca de compostos com características de interação semelhantes às aquelas encontradas no modelo farmacofórico construído, os compostos selecionados foram chamados de *hits*.

Com os *hits* e os *decoys* encontrados, foi realizada a validação por meio de curva ROC.

#### **4.2.4.1 Construção da Curva ROC (Receiver operating characteristic)**

A curva ROC foi utilizada para validar o modelo farmacofórico construído e para verificar se o modelo é capaz de diferenciar os compostos ativos dos *decoys* a partir de suas características.

Os dados obtidos após a busca do banco de dados no programa Sybyl-X v2.1.1 foram transmitidos ao Excel v14.6.7 a fim de se obter uma taxa de verdadeiros positivos e outra de falsos positivos.

Ambas as colunas das taxas acima citadas foram copiadas para o programa GraphPad Prism v7b e foram geradas a curva ROC e a AUC.

#### **4.2.5 Validação do Modelo Farmacofórico da enzima CPB2.8 de *L. mexicana***

Foi realizada uma busca no banco de dados ChEMBL a fim de se obter compostos bioativos na enzima CPB2.8 de *L. mexicana*, porém não há nesse banco de dados nenhum composto descrito para essa enzima, então realizou-se uma busca em bancos de dados de artigos científicos já publicados com dados de inibição enzimática contra a enzima.

Não há na literatura muitos dados sobre a enzima CPB2.8, mas foi possível, selecionar 28 compostos com atividade de inibição abaixo de 10  $\mu\text{M}$ .

A partir dos 28 compostos ativos, foram gerados *decoys* no banco de dados DUD-e a fim de prosseguir a validação através da curva ROC. Porém não foi possível gerar uma quantidade de *decoys* que desse um valor significativo para construir a curva ROC, e por não ter dados sobre a atividade dos compostos no sítio ativo da enzima.

Então, os estudos de triagem virtual foram prosseguidos utilizando o modelo farmacofórico construído e a validação será realizada com os ensaios de inibição e cinética enzimática.

#### 4.2.6 Triagem virtual

Após a validação dos modelos farmacofóricos, a triagem virtual foi realizada utilizando os subconjuntos *all purchasable* e *all boutique* do banco de dados ZINC (IRWIN; SHOICHET, 2005; IRWIN et al., 2012) que é um banco de dados de compostos disponível *on-line* contendo aproximadamente 35 milhões de compostos.

Inicialmente, foi realizada no programa Ômega v3.0.0.1 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM) uma filtragem do banco de dados utilizando um filtro de propriedades físico-químicas baseado em dados de inibidores já conhecidos da enzima cruzaina, presentes no banco de dados ChEMBL (ID: ChEMBL3563 - <https://www.ebi.ac.uk/chembl>). As seguintes propriedades foram utilizadas:

- ✓ número de doadores de ligação de hidrogênio entre 1 e 5
- ✓ número de aceptores de ligação de hidrogênio entre 1 e 5
- ✓ logaritmo do coeficiente de partição octanol/água (logP) entre 2 e 5
- ✓ massa molecular entre 300 e 500 (u)
- ✓ área de superfície polar entre 50 e 150
- ✓ máximo 1 grupo nitro para evitar toxicidade
- ✓ carga formal entre -2 e 2 para evitar problemas de permeabilidade celular

A partir da aplicação deste filtro a triagem virtual foi realizada no módulo UNITY implementado no pacote computacional Sybyl-X v2.1. Nesta etapa o objetivo foi

selecionar compostos que fossem compatíveis com o modelo farmacofórico das proteínas cruzaina e CPB2.8.

#### 4.2.6 Ancoramento Molecular

A etapa de Ancoramento molecular foi realizada no programa GOLD v5.5 (CCDC Software Ltd.) em computador PC Windows.

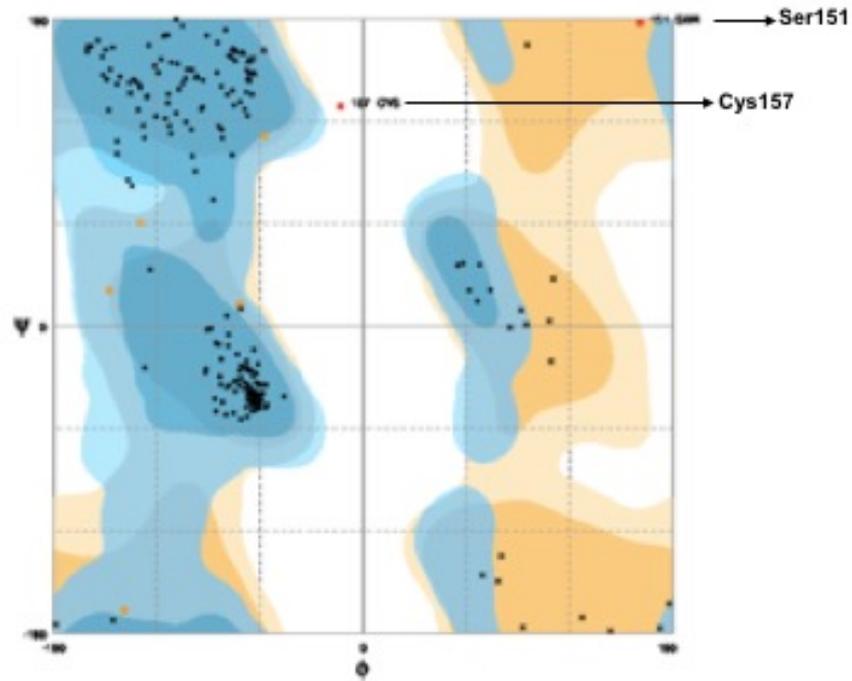
Iniciou-se com a validação do ancoramento molecular utilizando a metodologia de *redocking* variando a caixa de docagem entre 7 Å - 10 Å.

As estruturas das proteínas foram preparadas utilizando o módulo Hermes v1.8.2 do programa GOLD v5.5 (CCDC Software Ltd.). Nessa etapa retirou-se o ligante, co-cristalografado e as moléculas de água. Ressaltamos que todas as moléculas de água foram retiradas após análise e verificação de que nenhuma delas estava envolvida na interação entre os resíduos catalíticos e o ligante co-cristografado. Verificou-se também que não havia moléculas de água essenciais para manter a estrutura terciária da proteína.

A docagem foi realizada utilizando como ponto central uma caixa de docagem de 7 Å (foi a que melhor apresentou resultados na validação) a partir da Cys25 (resíduo catalítico). Foram realizadas 30 rodadas de ancoramento para cada ligante. Esta primeira docagem foi realizada para excluir os compostos que não respeitavam as interações identificadas pelo modelo farmacofórico e compostos com pontuação baixa pela função *GOLDSCORE*. A análise dos resultados foi realizada utilizando o programa PyMOL v1.6



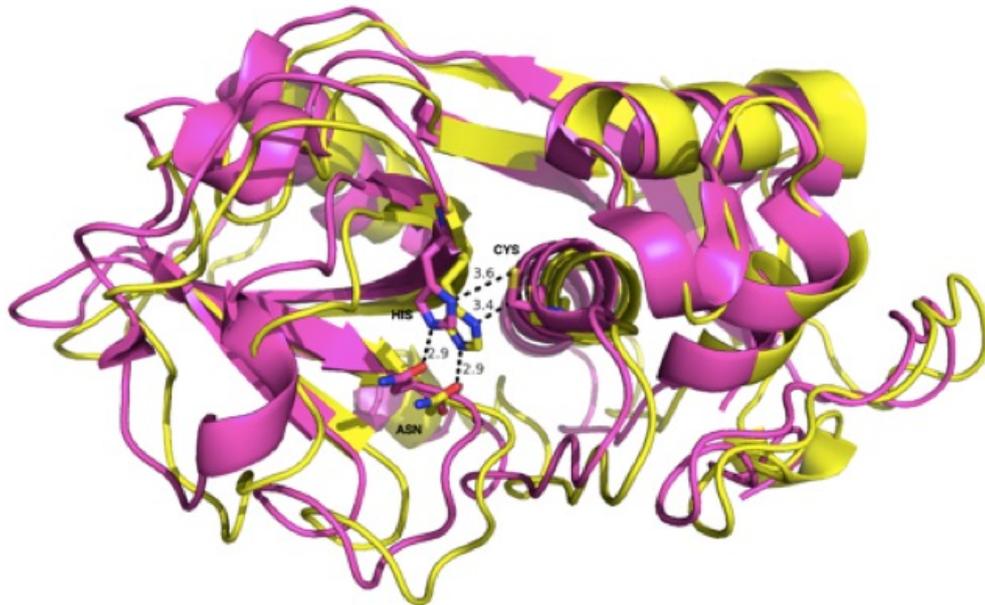
Figura 7 – Gráfico de Ramachandran do modelo obtido por Modelagem Comparativa



Legenda: Nas setas estão os resíduos *outliers* Ser151 e Cys157

Foi realizada a análise visual da sobreposição entre o modelo obtido (CPB2.8) e o molde utilizado (Figura 8). A sobreposição das estruturas mostrou que a região do sítio ativo do modelo de CPB2.8 não foi alterado quando comparado ao molde *pdb*: 3I06 de cruzaina, mantendo a posição dos resíduos da tríade catalítica (His, Cys e Asn) e o *fold* da proteína.

Figura 8 – Sobreposição do modelo de CPB2.8 (amarelo) e a estrutura cristalográfica do molde de cruzaina (rosa – *pdb*: 3I06)

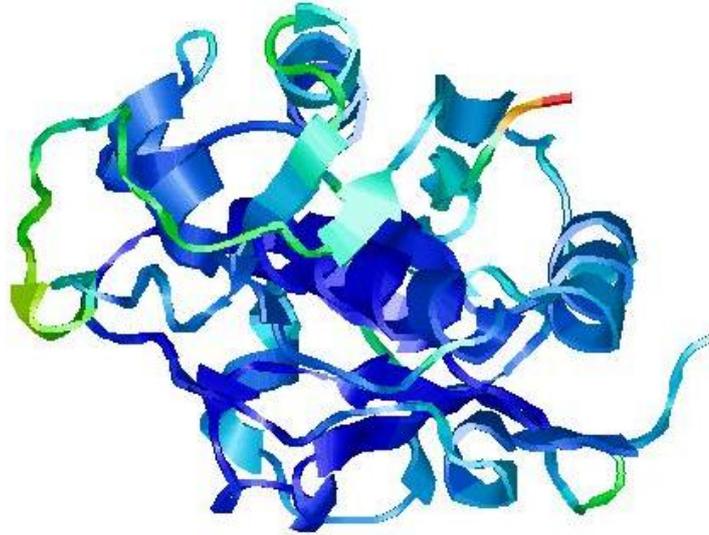


Legenda: Em formato *stick* rosa estão os resíduos da tríade catalítica (His, Cys e Asn) da estrutura cristalográfica da enzima cruzaina (*pdb*: 3I06). Em amarelo estão os resíduos da tríade catalítica do modelo de CPB2.8 construído. Os pontos pretos com as numerações são as distâncias entre cada resíduo.

A etapa de validação foi realizada segundo parâmetros descritos no servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) e foram obtidos os seguintes resultados:

- ✓ Valor de *p-value* de  $4.068 \times 10^{-5}$  (valores menores que  $p < 0,001$  são aceitáveis);
- ✓ *Score* de qualidade do modelo apresentou um valor de 0,7688 (valores maiores que 0,4 indicam modelos mais confiáveis e com alta similaridade com a estrutura nativa);
- ✓ Visualização 3D dos resíduos errados (Figura 9): é uma representação que indica a acurácia do modelo e é medida pelas cores:
  - Azul: regiões com alta acurácia
  - Vermelho: regiões com baixa acurácia

Figura 10 – Visualização 3D da acurácia da posição dos resíduos



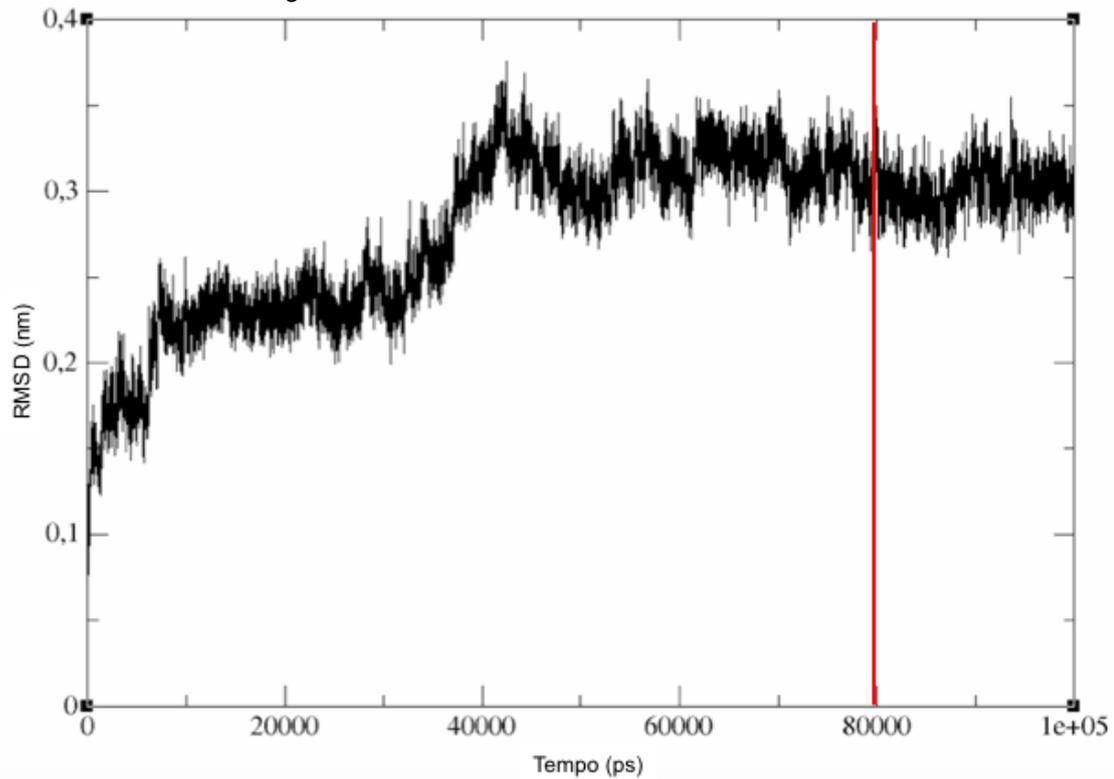
Legenda: regiões azuis: resíduos em posição confiável; regiões vermelhas: resíduos em posições não confiáveis

Os resultados obtidos a partir da construção e validação do modelo descritos acima sugerem que o modelo tem qualidade suficiente para ser considerado validado e pode ser utilizado nos próximos passos.

## 5.2 Simulação por Dinâmica Molecular - Campo de Força AMBER99SB-ILDN

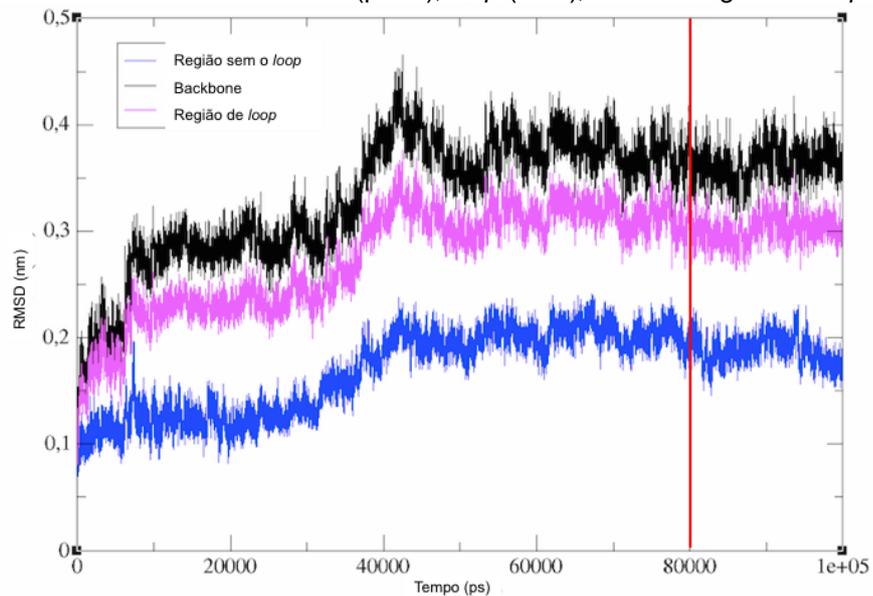
A simulação por dinâmica molecular foi realizada utilizando o campo de força, AMBER99SB-ILDN o qual contém parâmetros para cálculos em proteínas (LINDORFF-LARSEN et al., 2010). Nesta etapa, a simulação foi realizada sem ligante, pois tentativas de realizar a simulação com o substrato natural da enzima não foram bem sucedidas, uma vez que o substrato sai do sítio da proteína após 5ns de simulação. Após, foram realizadas algumas etapas de validações.

A primeira etapa de validação realizada foi a análise do gráfico de RMSD (*root mean square deviation* – raiz média do desvio quadrático) do *backbone* (cadeias principais) da proteína (Figura 11). Nesta análise, é possível verificar o gráfico do RMSD *versus* os passos (tempo) em picossegundos da simulação. Foi observado neste gráfico que o modelo estabilizou a partir de 80ns e se manteve estável até o fim da simulação.

Figura 11 – RMSD do *backbone* do modelo de CPB2.8

Legenda: Barra vermelha indica região de estabilização do modelo (80 ns)

O gráfico de RMSD foi gerado também para as regiões de *loop* (regiões flexíveis) e para região sem o *loop*, a fim de verificar se o aumento entre 30 e 50 ns ocorreu devido à presença de região de *loop*, que é uma região bastante flexível e de difícil estabilização (Figura 12).

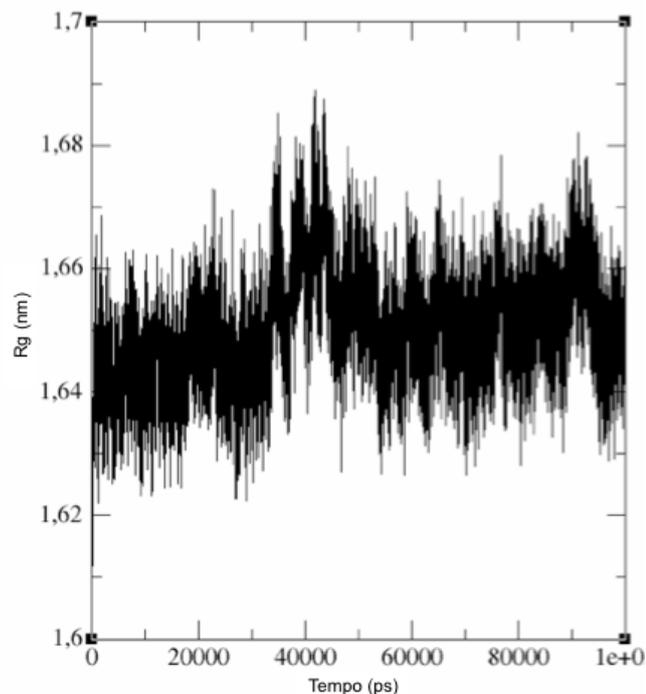
Figura 12 – RMSD do *backbone* (preto), *loop* (rosa), e sem a região de *loop* (azul)

Este resultado mostra que a região de *loop* aumenta o RMSD do *backbone*, pois quando comparamos as três regiões (*backbone*, *loop* e região sem o *loop*), verificamos que esse aumento só aparece quando geramos o gráfico do *backbone* e do *loop*, mas não é possível verificar um aumento significativo quando comparamos ao gráfico da proteína sem a região de *loop*.

Isso indica que a região do *loop* da proteína é a principal causa dos picos que aparecem no RMSD, visto que se trata de uma região de grande mobilidade. Ao observar na figura a região sem o *loop*, verificou-se que o RMSD é estável, o que comprova ainda mais a estabilidade da proteína.

Após o RMSD, foram verificados os gráficos de raio de giro (Figura 13) e a área de superfície hidrofóbica (Figura 14).

Figura 13 – Gráfico do Raio de giro do modelo obtido



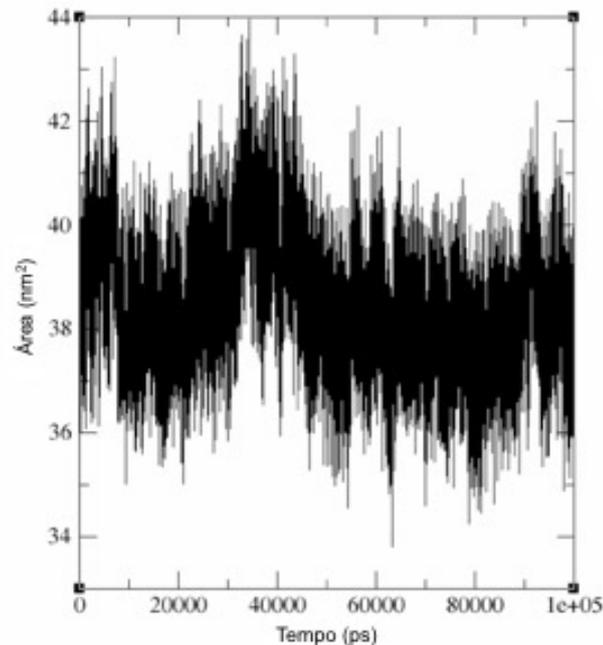
O raio de giro indica mudanças conformacionais na proteína ao longo do tempo e avalia o grau de compactação em função do tempo (van der SPOEL et al. 2013).

No modelo, observou-se que houve um pequeno aumento em aproximadamente 90ns, o que não é esperado para resultados de raio de giro. Porém, como a proteína não foi simulada com um ligante, esse resultado é aceitável, uma vez que a proteína pode compactar e sofrer uma pequena descompactação ao longo do

tempo. Como pode-se observar na Figura 13, ocorre o aumento em 90ns, seguido de uma queda, indicando que a proteína volta à compactação.

O gráfico de área de superfície hidrofóbica (Figura 14) representa a área da proteína acessível ao solvente. Nesse caso, é interessante que não haja um aumento, em especial da área hidrofóbica. Porém, foi observado um aumento no gráfico, tal aumento seguiu o mesmo padrão encontrado no gráfico do raio de giro, o que também indica que esses resíduos estiveram expostos ao solvente em 90ns e depois retornaram para o estado esperado.

Figura 14 – Gráfico da área de superfície hidrofóbica do modelo obtido



Os resultados acima indicam que o modelo de proteína construído está estável, porém a falta do ligante pode acarretar em um maior movimento dos resíduos. Isto é aceitável, uma vez que na presença do ligante a proteína tende a manter uma conformação mais estável (GRUTSCH et al., 2014).

Outras etapas de validação foram realizadas, como a análise das interações de hidrogênio entre os resíduos da tríade catalítica (Cys26; His164 e Asn184). Foi verificado nesta análise, que há uma interação entre os resíduos de His164 e Asn184 (Figura 15), mas a mesma interação não ocorre entre o resíduo de Asn184 e Cys26 (Figura 16) e nem entre o resíduo de His164 e Cys26 (Figura 17). Esse resultado corrobora com o esperado, uma vez que, o resíduo de Cys26 deve estar desprotonado

para que ocorra o ataque nucleofílico ao substrato. No mecanismo de catálise o resíduo de His164 é quem retira o próton da Cys26, portanto, não deve ocorrer uma ligação de hidrogênio entre esses resíduos.

Figura 15 – Frequência da ligação de hidrogênio entre os resíduos His164 e Asn184

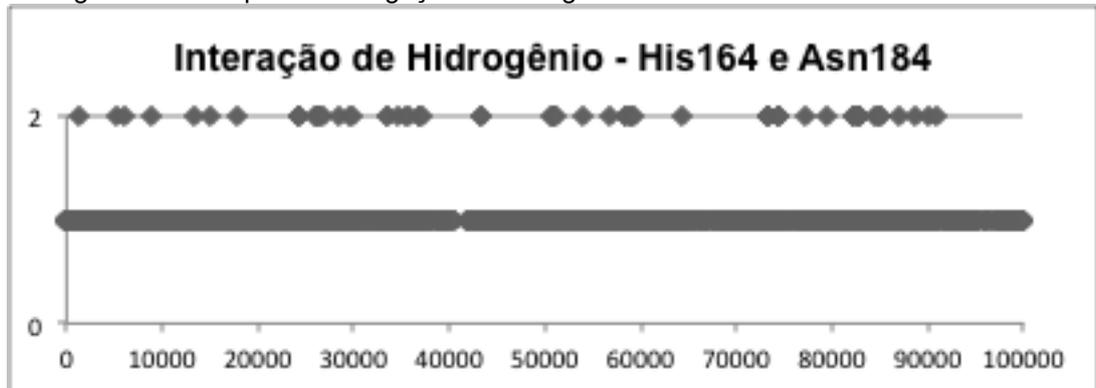


Figura 16 – Frequência da ligação de hidrogênio entre os resíduos His164 e Cys26

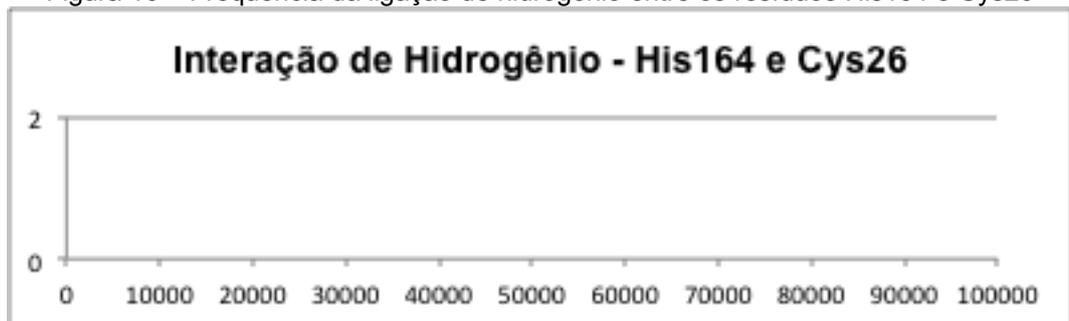
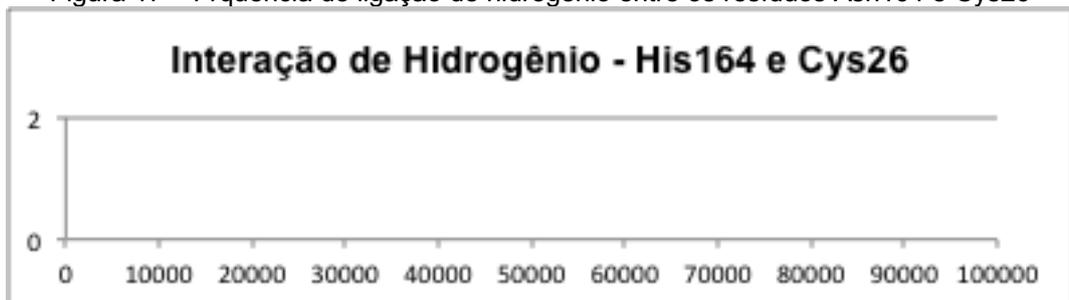


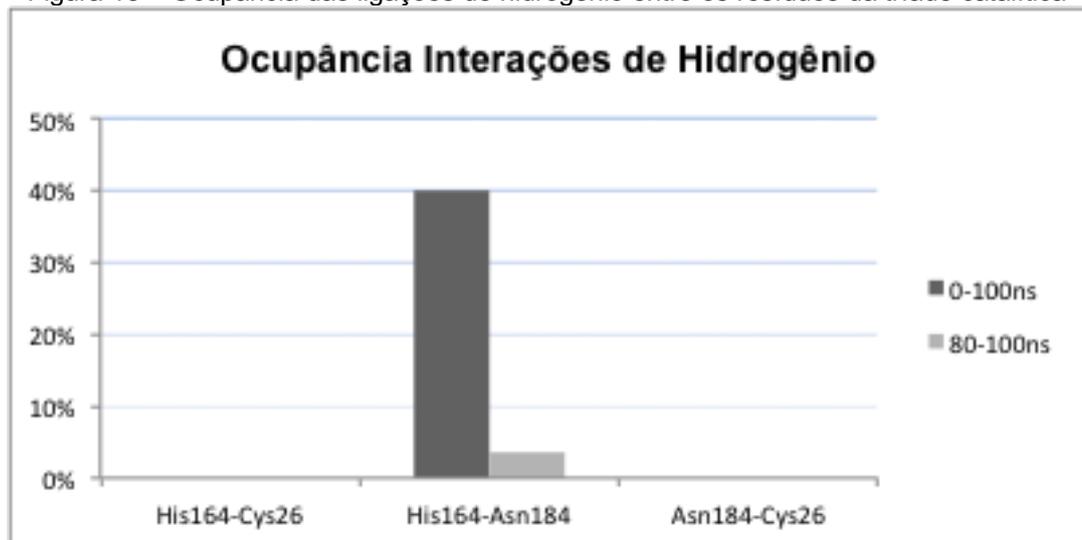
Figura 17 – Frequência de ligação de hidrogênio entre os resíduos Asn164 e Cys26



Foi realizada uma análise para verificar a frequência percentual da ligação de hidrogênio entre os resíduos de His164 e Asn184 (Figura 18). Foi possível verificar que esses resíduos interagem durante 40% do período total da DM (100 ns). Na porção onde a DM estabilizou (80-100ns) observou-se que 3% do tempo ocorre essa mesma interação.

Isso nos mostra que a ligação de hidrogênio entre os resíduos de His164 e Asn184 ocorre, principalmente, a partir do momento em que a DM estabiliza, esse resultado é importante, pois por se tratarem de dois resíduos da tríade catalítica da enzima, essa ligação pode estabilizar o sítio catalítico da proteína para que o processo de catálise ocorra.

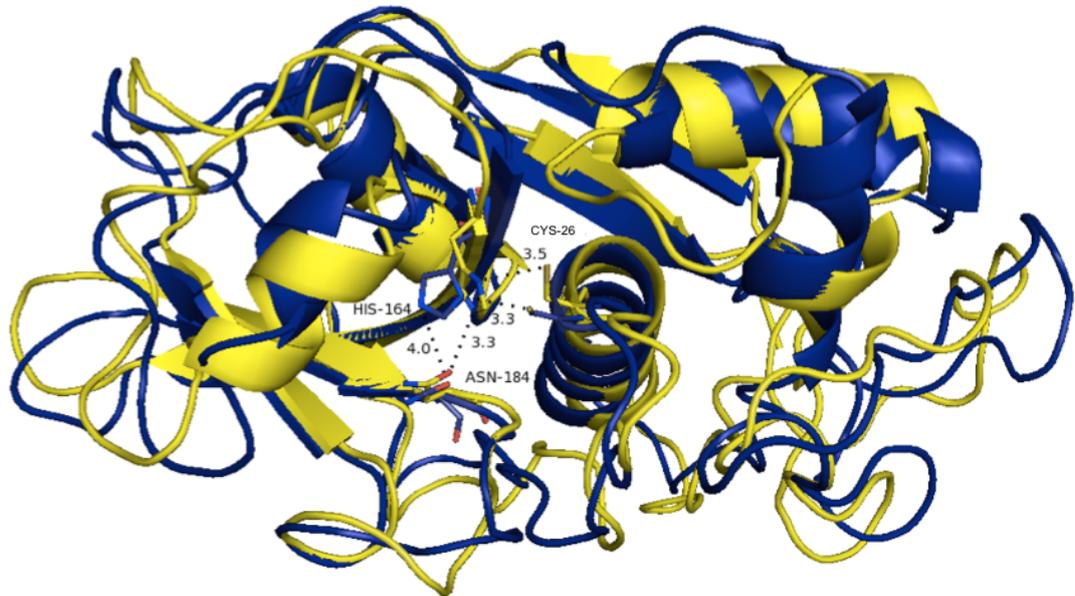
Figura 18 – Ocupância das ligações de hidrogênio entre os resíduos da tríade catalítica



Legenda: Em cinza escuro o percentual de frequência da ligação de hidrogênio durante o período total da simulação. Em cinza claro o mesmo percentual, porém durante o período de estabilização da simulação (80-100 ns)

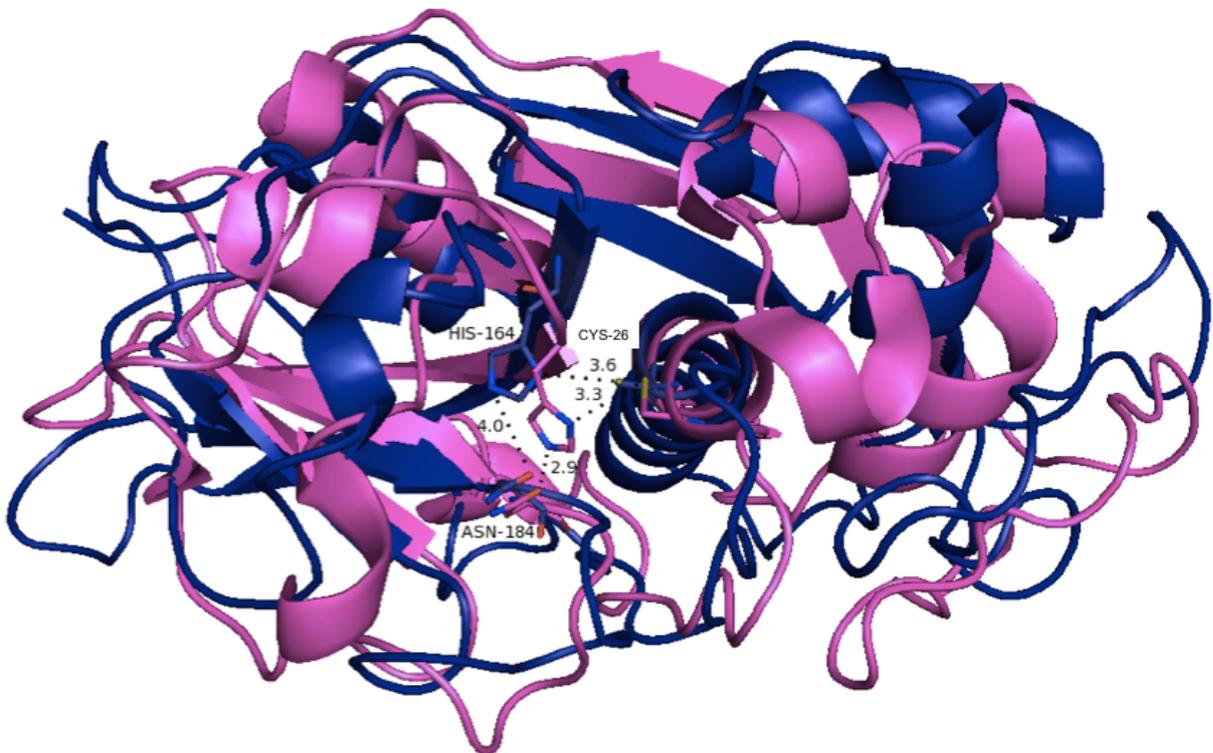
Foi realizada a sobreposição da estrutura antes (amarelo) e depois da DM (azul) (Figura 19); e também uma comparação entre o modelo obtido após a DM e o molde (rosa - pdb: 3I06) (Figura 20) no programa PyMOL v1.6.

Figura 19 – Sobreposição das estrutura antes e depois da simulação por DM



Legenda: sobreposição do modelo antes da DM (amarelo) e modelo após a DM (azul); stick: resíduos da tríade catalítica; pontos pretos: distâncias entre os resíduos.

Figura 20 – Sobreposição das estrutura após a simulação por DM e molde *pdb*: 3I06



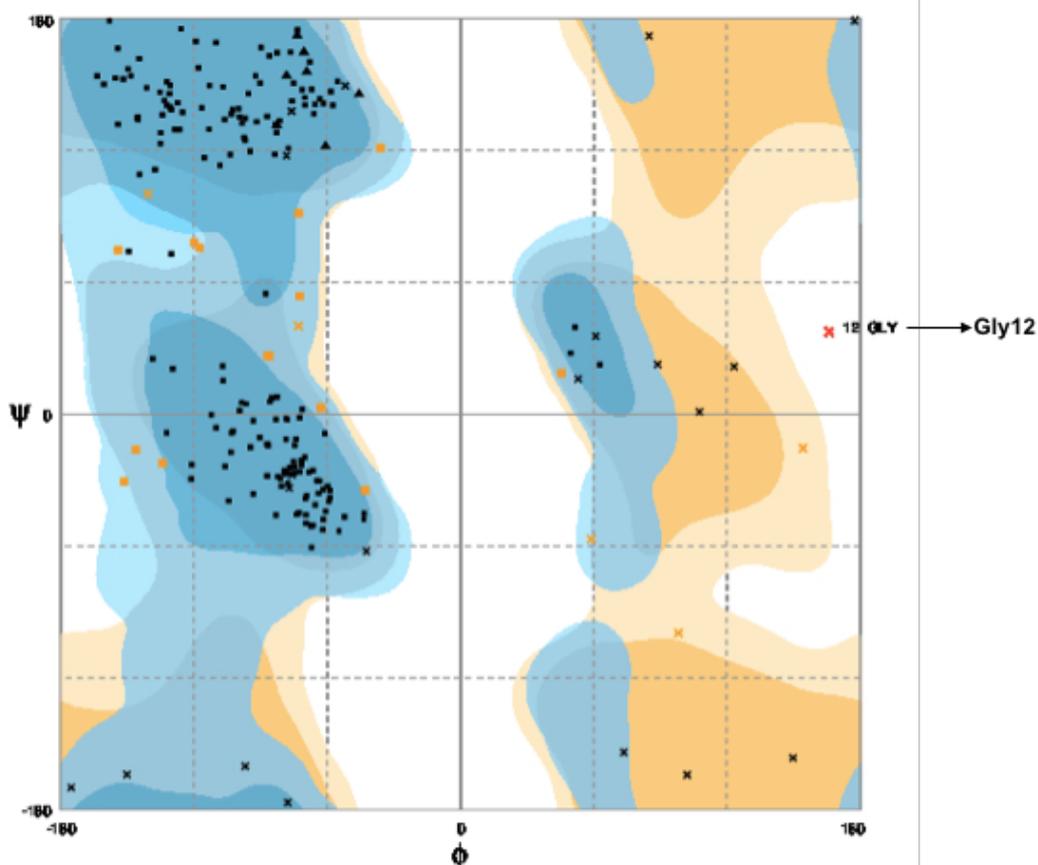
Legenda: modelo após a DM (azul) e molde (rosa - *pdb*: 3I06); em stick os resíduos da tríade catalítica; e os pontos pretos: distâncias entre os resíduos.

Verificou-se na figura 19 que os resíduos da tríade catalítica tiveram uma movimentação; o principal resíduo da tríade, a Cys26 mudou de posição obtendo uma distância de 3,3 Å comparada à 3,5 Å antes da DM. E os outros resíduos também movimentaram, a His164 apresentava antes da DM uma distância de 3,3 Å para o resíduo de Asn184, e essa distância foi aumentada para 4 Å após a DM. Não foram observadas alterações significativas na estrutura da proteína. Alterações são esperadas após a DM, pois a simulação é realizada para refinar o modelo construído, então haverá movimentação e alteração de estrutura.

Na figura 20, verificou-se a diferença entre o modelo após a DM e o molde utilizado para a construção. O resíduo de Cys26 apresentou uma distância próxima ao resíduo de Cys25 do molde (3,3 Å e 3,6 Å, respectivamente). Já o resíduo de His164 apresentou uma movimentação maior, 4 Å comparado à 2,9 Å do molde. Em relação à estrutura, foi possível observar algumas diferenças na formação de folha beta e alfa-hélice, vale lembrar que não se trata da mesma proteína e que apesar de altamente semelhantes ainda há uma diferença na sequência primária, o que pode estar relacionado com a diferença na estrutura terciária da proteína, uma vez que a interação entre os resíduos leva à formação da estrutura terciária.

No gráfico de Ramachandran (Figura 21), verificou-se apenas um resíduo em região de *outlier* (Gly12 – 0,5%), 8,9% dos resíduos em regiões permitidas e 90,6% em regiões favoráveis. Apesar dos resíduos em regiões favoráveis terem diminuído quando comparado ao gráfico do modelo antes da dinâmica, apenas um resíduo foi encontrado em região de *outlier*, diferentemente do mesmo gráfico apresentado antes da DM, no qual observou-se dois resíduos *outlier*. E neste caso, o único resíduo encontrado fora da região permitida foi o resíduo de glicina, que é descrito como permitido em regiões desfavoráveis uma vez que não apresenta cadeia lateral volumosa (VERLI, 2014).

Figura 21 – Gráfico de Ramachandran do modelo após a DM



Legenda: seta mostra o resíduo de Gly12 que é um *outlier*.

### 5.3 Modelos Farmacofóricos

Como dito anteriormente, os MIFs foram gerados a partir das sondas químicas: H<sub>2</sub>O, Dry, C1, C3, N:, N1, O, COO<sup>-</sup>, Ar. COO<sup>-</sup>, CONH<sub>2</sub>, Ar. CONH<sub>2</sub>. Após a geração dos campos de interação, foi realizada uma análise dos campos para posterior construção do farmacóforo.

#### 5.3.1 Modelo Farmacofórico CPB2.8

Os pontos de interação discutidos abaixo foram encontrados na análise das sondas químicas obtidas após o cálculo dos *MIFs*. Os estudos foram realizados de maneira comparativa, sendo utilizadas para a construção do farmacóforo as regiões observadas somente na enzima CPB2.8 não tendo sido encontradas nas outras

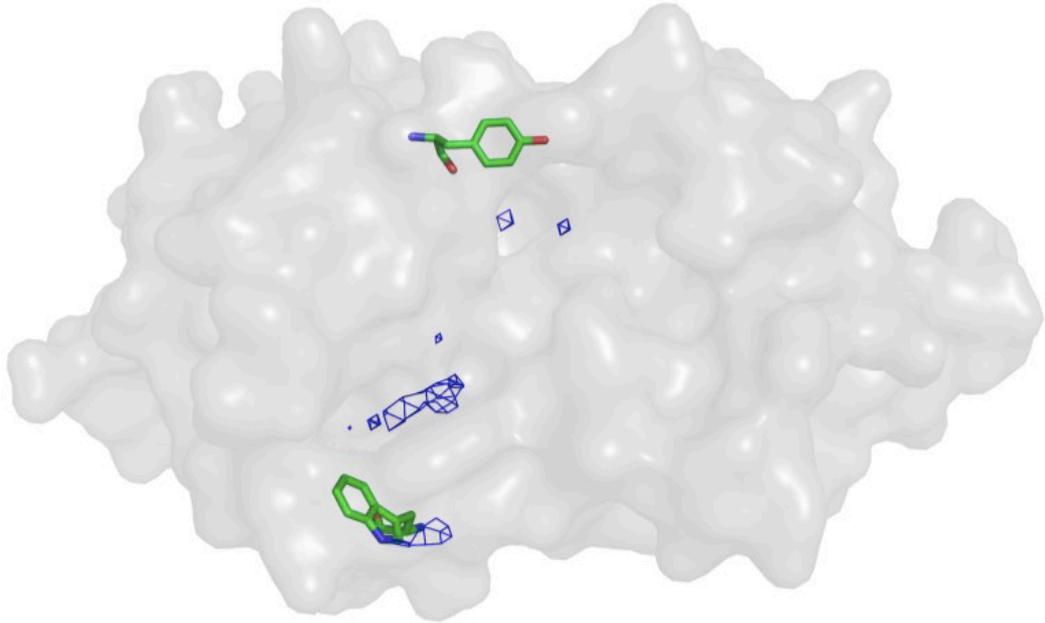
proteínas analisadas. Baseado nas características que serão descritas, foi construído o modelo farmacofórico da proteína CPB2.8.

Na figura 22, observou-se a presença da sonda Dry que representa características hidrofóbicas. Os campos calculados se apresentaram próximos aos resíduos de tirosina na porção do bolso S2 da enzima e um resíduo de triptofano no bolso S2'. O bolso S2 foi descrito por ser uma região que aceita grupos hidrofóbicos na enzima CPB2.8, corroborando com os resultados obtidos pela presença da sonda química hidrofóbica (ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b; ALVES et al., 2001c). Este resultado indica que essas regiões podem acomodar um ligante com características hidrofóbicas que pode interagir com esses dois resíduos por interações do tipo empilhamento- $\pi$ .

Ainda observando os resultados provenientes das sondas com características hidrofóbicas, verificou-se que a sonda C1, a qual indica interação com carbonos vinílicos e/ou aromáticos também sugere regiões próximas aos dois bolsos descritos acima (Figura 23).

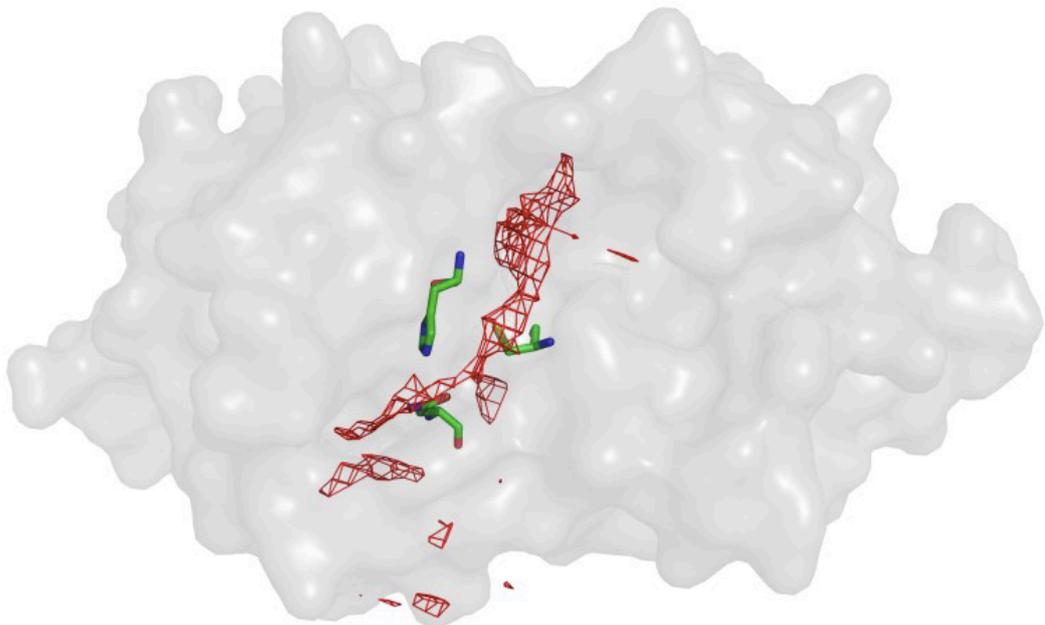
Como encontramos características hidrofóbicas na região do bolso S2 e o mesmo já foi descrito na literatura por acomodar estruturas com essa característica, começou-se a construção do modelo farmacofórico adicionando dois pontos hidrofóbicos; um na região do bolso S2 e outro na região do bolso S2' (Figura 24).

Figura 22 – Sonda Dry presente no bolso S2 e S2' da enzima CPB2.8



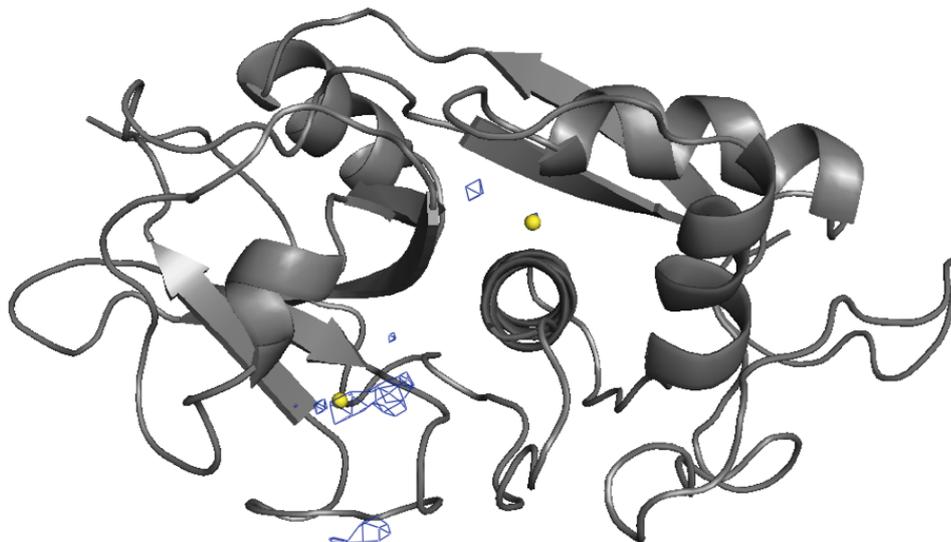
Legenda: Branco: enzima CPB2.8 mostrada em superfície de área acessível ao solvente. Em azul a sonda Dry na região do bolso S2 e S2'. Em verde os resíduos Tyr210 e Trp190 possíveis pontos de interação hidrofóbica.

Figura 23 – Resíduos da tríade catalítica (Cys26, His164 e Asn184) com a sonda C1 (vermelho)



Legenda: Em vermelho a sonda C1 na região do bolso sítio catalítico e também nos bolsos S2 e S2'. Em verde os resíduos His164 e Cys26 e Asn184 da tríade catalítica.

Figura 24 – Pontos hidrofóbicos adicionado para construção do modelo farmacofórico



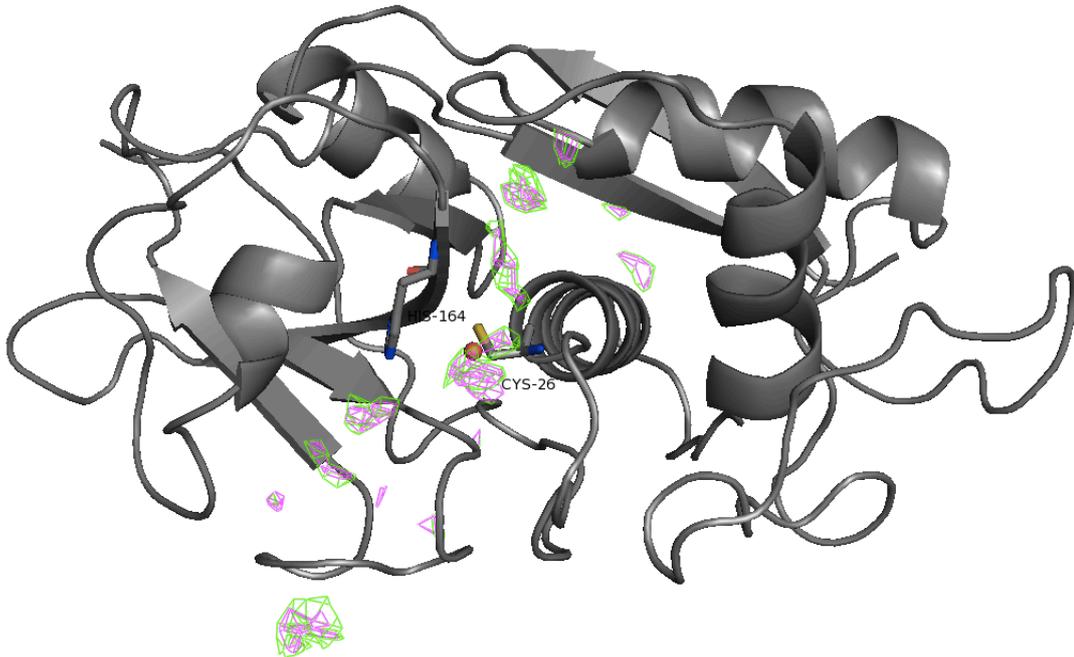
Legenda: Em cartoon cinza a estrutura da enzima CPB2.8; em amarelo dois pontos hidrofóbicos adicionados na região da sonda Dry em azul.

Duas sondas com características aceptoras de ligação de hidrogênio foram analisadas (N: e O) (Figura 25) com o intuito de encontrar regiões com essas característica no sítio ativo, uma vez que esse tipo de ligação é a mais importante presente nos sistemas biológicos (BARREIRO, 2015). Os campos de interação sugeridos por essas sondas foram observados na região do sítio catalítico, em específico entre os resíduos de His164 e Cys26. Esse ponto foi escolhido para a adição de um ponto aceptor de ligação de hidrogênio na construção do farmacóforo visto que a His164 participa no processo de catálise retirando o próton da Cys26. Neste caso, se a His164 retirar um próton do ligante ao invés de retirar da Cys26 pode ser que ocorra uma inibição da atividade catalítica, por isso esse foi um ponto escolhido.

A sonda N1 que apresenta características de doador de ligação de hidrogênio, indicou a distribuição dos campos de interação por grande parte do sítio catalítico da enzima (Figura 26). Foram então adicionados dois pontos de doadores de ligação de hidrogênio no modelo farmacofórico conforme a figura 26.

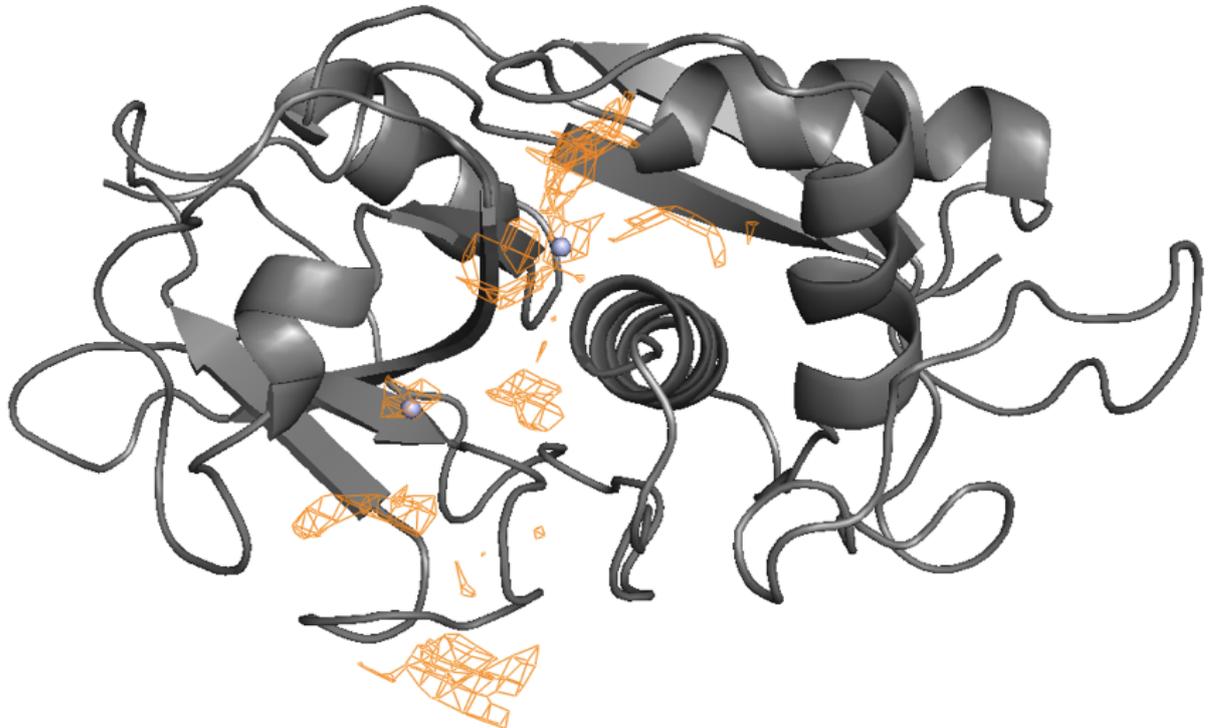
Baseado nesse 5 pontos de interação (dois hidrofóbicos, dois doadores de ligação de hidrogênio e um aceptor de ligação de hidrogênio), o modelo farmacofórico da enzima CPB2.8 foi construído (Figura 27) e seguiu-se para a etapa de triagem virtual.

Figura 25 – Ponto acceptor de ligação de hidrogênio



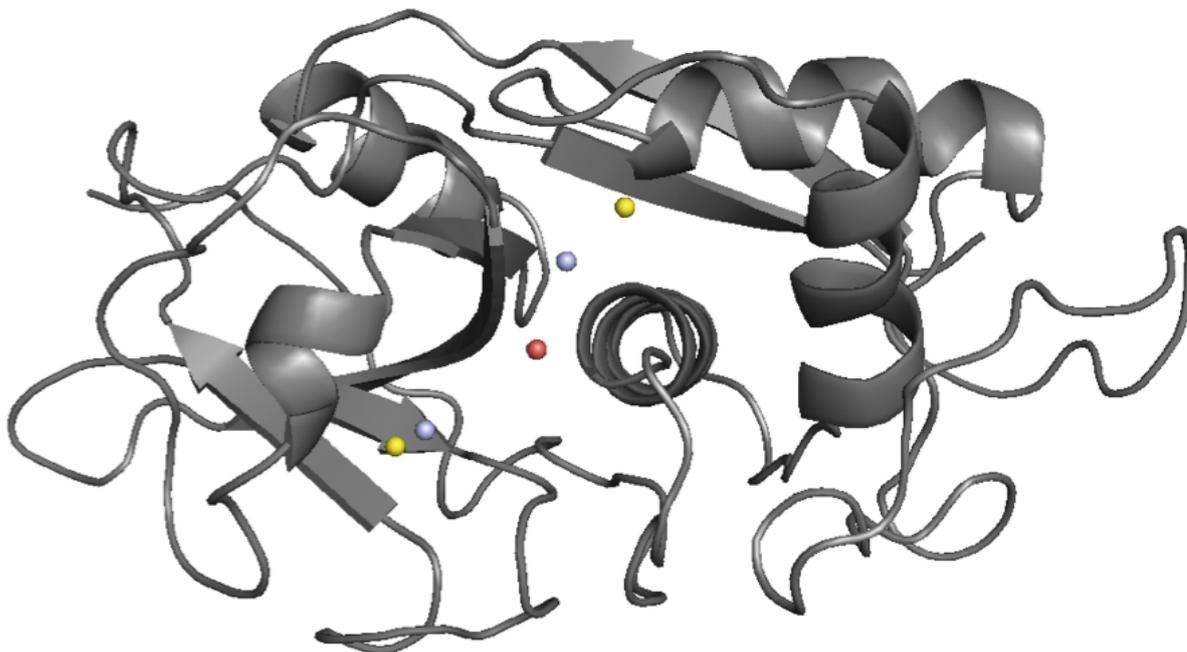
Legenda: Em verde a sonda O (oxigênio  $sp^2$  acceptor de ligação de hidrogênio); em magenta a sonda N: (nitrogênio acceptor de ligação de hidrogênio). Em vermelho o ponto de acceptor de ligação de hidrogênio que foi adicionado no modelo farmacofórico. Em *stick* os resíduos His164 e Cys26 da tríade catalítica.

Figura 26 – Pontos doadores de ligação de hidrogênio



Legenda: Em laranja a sonda N1 (nitrogênio doador de ligação de hidrogênio); em azul os pontos doadores de ligação de hidrogênio que foram adicionados no modelo farmacofórico.

Figura 27 – Modelo farmacofórico da enzima CPB2.8



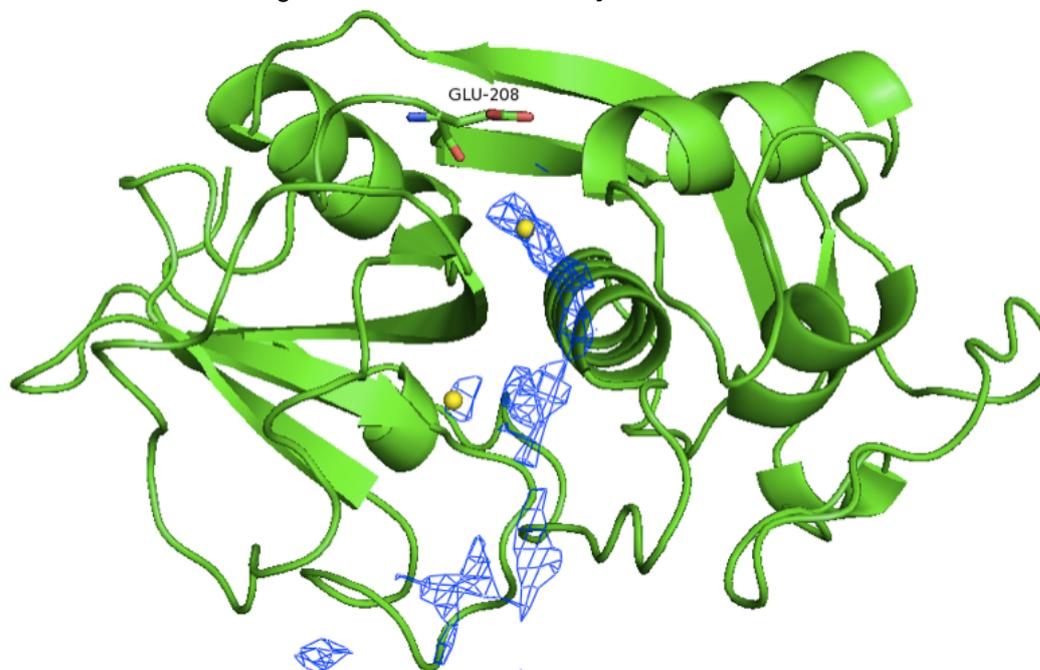
Legenda: Em amarelo pontos hidrofóbicos, em azul dois pontos doadores de ligação de hidrogênio e em vermelho ponto de acceptor de ligação de hidrogênio.

### 5.3.2 Modelo Farmacofórico cruzaina

A sonda C1 (interação com carbono vinílico e/ou aromático) assim como para a enzima CPB2.8, mostrou os campos de interação distribuídos pelo sítio ativo da enzima mais especificamente nos bolsos S2 e S1' (Figura 28).

Como descrito no tópico 2.3.1, o bolso S2 é descrito na literatura por ser uma região que aceita interações com grupos hidrofóbicos, mas no caso da cruzaina essa região também pode fazer interações com grupos básicos devido a presença de um resíduo de ácido glutâmico (Glu208) o qual apresenta diferença na orientação de acordo com as características do ligante (ALVES et al., 2001a; ALVES et al., 2001b; ALVES et al., 2001c). Devido a essas características do bolso S2 e dos resultados apresentados pela sonda C1, foi colocado dois pontos hidrofóbicos na região do bolso S2 e do S1'.

Figura 28 – Pontos de interações hidrofóbicas e sonda C1



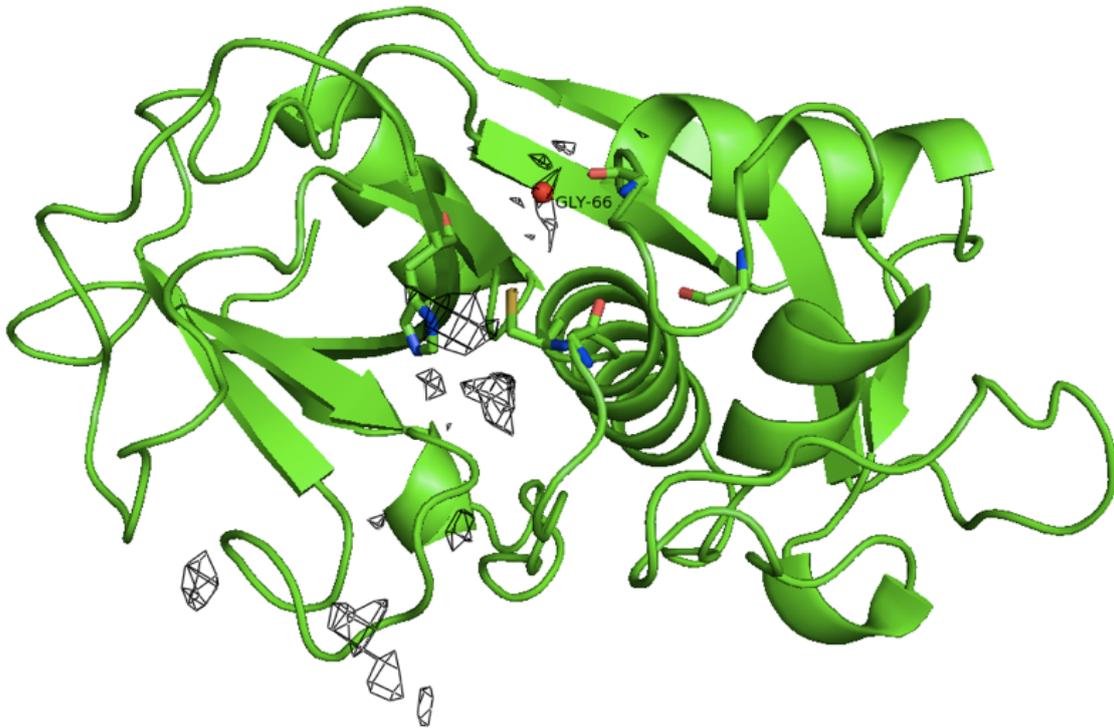
Legenda: Em cartoon verde a estrutura da enzima cruzaina; em *stick*: o resíduo de Glu208 que abre e fecha o bolso S2. Em amarelo os pontos hidrofóbicos adicionados para a construção do farmacóforo e em azul a sonda C1.

A sonda com característica aceptora de ligação de hidrogênio (N:) apresentou campos de interação em uma região próxima ao resíduo de Gly66, o qual é descrito como importante para o reconhecimento de inibidores de cruzaina (WIGGERS et al., 2013). Devido a essa característica importante, um ponto acceptor de ligação hidrogênio foi adicionado nessa região (Figura 29).

Por fim, como a sonda com característica doadora de ligação de hidrogênio (N1) sugere campos de interação próximos aos resíduos His162 e Cys25 e o resíduo de histidina pode se comportar tanto como doador quanto como acceptor de ligação de hidrogênio, foi adicionado um ponto doador próximo ao resíduo de His162 (figura 30).

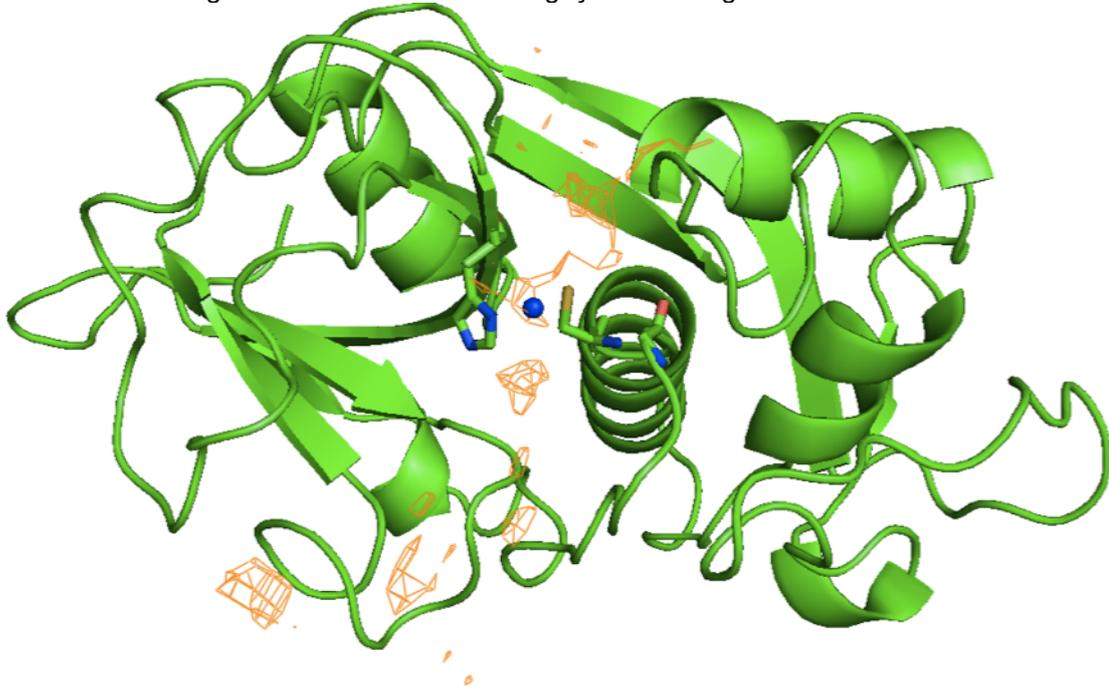
Após essas análises o modelo farmacofórico de cruzaina foi construído contendo dois pontos hidrofóbicos, um ponto acceptor de ligação de hidrogênio e um ponto doador de ligação de hidrogênio (Figura 31) e foi dada continuidade a etapa de triagem virtual.

Figura 29 – Ponto aceptor de ligação de hidrogênio e sonda N:



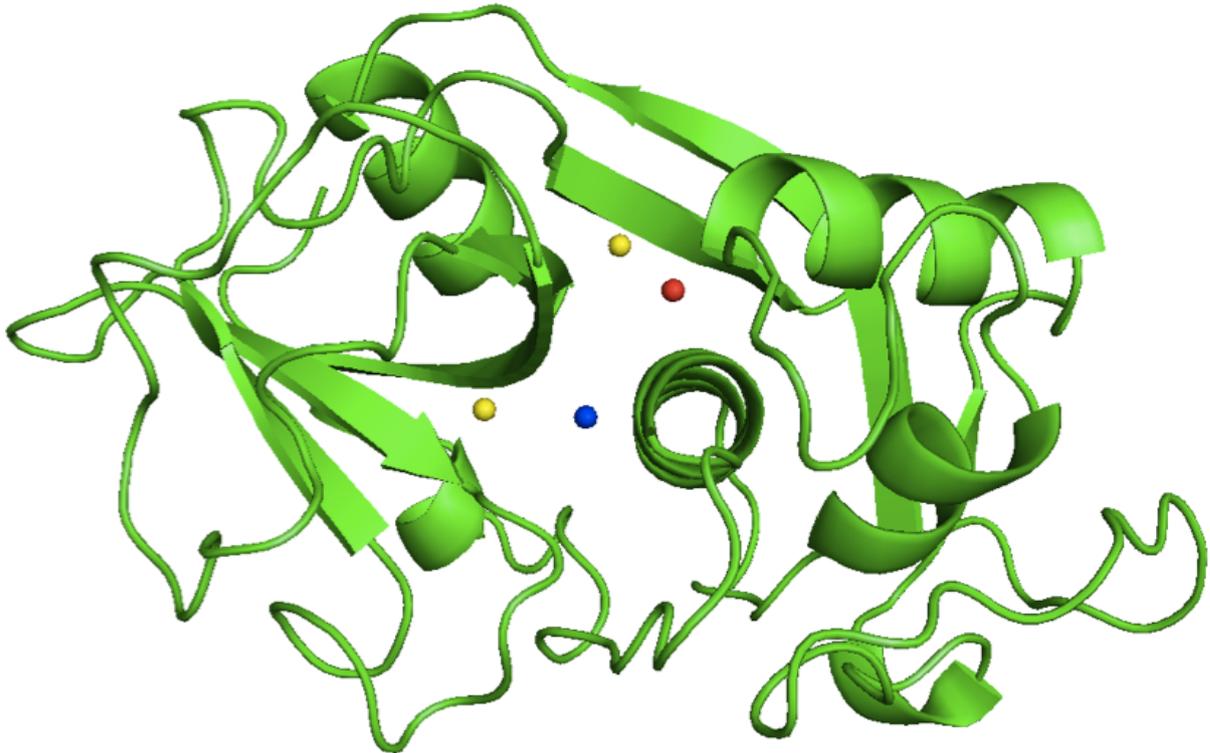
Legenda: *Stick*: resíduo de Gly66 importante para ligação com inibidores de cruzaina e resíduos da tríade catalítica His162 e Cys25. Em preto a sonda N: com característica aceptora de ligação de hidrogênio (vermelho)

Figura 30 – Ponto doador de ligação de hidrogênio e sonda N1



Legenda: *Stick*: resíduos His162 e Cys25. Em laranja a sonda N1 com característica doadora de ligação de hidrogênio. E em azul o ponto com característica de doador de ligação de hidrogênio.

Figura 30 – Modelo Farmacofórico da cruzaina



Legenda: Em amarelo pontos hidrofóbicos, em azul ponto doador de ligação de hidrogênio e em vermelho ponto de aceptor de ligação de hidrogênio.

## 5.4 Validação do modelo farmacofórico de cruzaina

### 5.4.1 Construção da curva ROC para validação do modelo farmacofórico da enzima cruzaina

A curva ROC ou COR (Característica de Operação do Receptor) é uma representação gráfica utilizada para ilustrar quantitativamente a habilidade de um teste diagnóstico em discriminar classes distintas (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003).

Foi desenvolvida durante a segunda guerra mundial para quantificar a capacidade dos operadores de radares em distinguir um sinal de um ruído. Entre as décadas de 60 e 70 passou a ser utilizada na área médica para diferenciar e classificar indivíduos doentes de não doentes. E tornou-se uma ferramenta utilizada para descrever de forma quantitativa a performance de um teste diagnóstico (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003).

A curva é gerada através da taxa de verdadeiros positivos (sensibilidade) versus a taxa de falsos positivos (1-especificidade). A área sob curva (AUC) representa a probabilidade do modelo encontrar os compostos ativos independente da quantidade e proporção de ativos e decoys. Quanto mais perto de 100% o valor da AUC, maior a capacidade da curva em discriminar ativos de decoys (MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003).

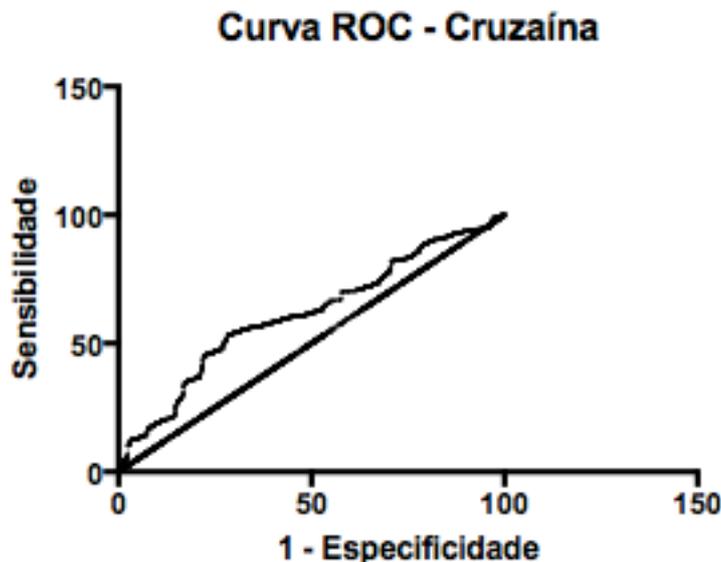
A validação do modelo farmacofórico de cruzaina foi realizada por meio da construção da curva ROC, que como dito anteriormente, é uma representação gráfica utilizada para verificar a robustez do teste.

No início da validação, a busca no banco de dados ChEMBL por inibidores de cruzaina resultou num total de 775 moléculas. Estas moléculas foram então analisadas quanto ao tipo de ensaio de inibição realizado, se haviam compostos repetidos ou não. Por fim, os compostos com  $IC_{50}$  menores que 10  $\mu$ M foram selecionados, resultando num total de 45 compostos ativos.

Os compostos foram então utilizados no banco de dados DUD-e para a geração de *decoys*. A partir do banco de dados DUD-e foram gerados um total de 2400 *decoys* (aproximadamente 50 *decoys* por composto).

Os *decoys* e os compostos ativos foram utilizados em uma triagem no modelo farmacofórico da enzima cruzaina por meio de estudo realizado no programa Sybyl-X v2.1.1 a fim de verificar se o modelo farmacofórico construído era capaz de distinguir os compostos ativos dos *decoys* previamente gerados. Os resultados deste estudo demonstraram que o modelo farmacofórico da cruzaina encontrou 21 *hits* (compostos que se encaixaram nas características farmacofóricas) do total de 45 compostos ativos; e 670 *decoys* do total de 2400. Esse resultado foi utilizado no programa GraphPad Prism v7b para a construção da curva curva ROC (Figura 31).

Figura 31 – Validação do modelo farmacofórico de cruzaina pela Curva ROC. Eixo X representa a 1-Especificidade e o eixo Y representa a sensibilidade do método



Na curva acima apresentada obtiveram-se um valor de AUC de 61%, este resultado se mostra adequado visto que a literatura diz que valores acima de 60% são aceitáveis e quanto mais próximo a 100%, melhor a acurácia do modelo (HEVENER et al., 2009; MARTINEZ; LOUZADA-NETO; PEREIRA, 2003).

A partir do resultado da curva com AUC 61% e com os dados da literatura que foram apresentados, os quais mostram os resíduos importantes para interação entre o inibidor e o sítio ativo da enzima e, também, levando em consideração que grande parte desses resíduos citados estão próximos dos pontos utilizados para a construção do modelo farmacofórico, considerou-se o modelo validado e pronto para os próximos passos da triagem virtual.

#### 5.4.2 Validação do Modelo Farmacofórico da enzima CPB2.8 de *L. mexicana*

A enzima CPB2.8 de *L. mexicana* não possui dados de ensaios enzimáticos e inibidores descritos no banco de dados ChEMBL. Deste modo, a busca por compostos ativos nessa enzima foi realizada na literatura de artigos científicos já publicados com dados de inibição enzimática contra a mesma.

A literatura atual não apresenta muitos dados sobre a enzima CPB2.8, mas foi possível selecionar 28 compostos com atividade de inibição descrita abaixo de 10  $\mu\text{M}$ .

A partir dos 28 compostos ativos, foram gerados os *decoys* no banco de dados DUD-e. Porém não foi possível realizar a validação por meio da curva ROC, pois a quantidade de *decoys* e compostos ativos não foram suficientes para gerar a curva com qualidade. Sendo necessária a quantidade de 50 *decoys* por composto ativo (HUANG; SHOICHET; IRWIN, 2006; MYSINGER, 2012).

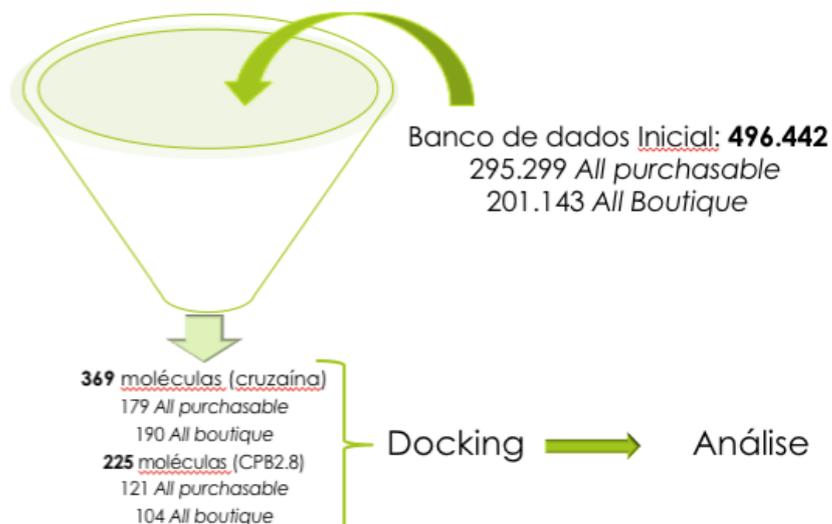
Então, como toda a construção do modelo de CPB2.8 foi realizada com base na estrutura da cruzaina e ambas possuem alta semelhança (60% de identidade), sugeriu-se continuar os estudos de triagem virtual e realizar a validação por ensaios de inibição e cinética enzimática.

## 5.5 Triagem Virtual

A triagem foi realizada utilizando os modelos farmacofórico descritos no item 5.4. Foi utilizada a busca flexível dos ligantes provenientes dos bancos *all purchasable* e *all boutique*.

A triagem foi iniciada com 496.442 moléculas, sendo 295.299 do banco *all purchasable* e 201.143 do banco *all boutique*, com o intuito de encontrar moléculas com características complementares ao modelo farmacofórico construído. Após o fim da buscavirtual, foram obtidas estruturas de moléculas candidatas a inibidores das proteína alvo, sendo 369 moléculas para a enzima cruzaina e 225 moléculas para a enzima CPB2.8 (Figura 32).

Figura 32 – Processo de triagem virtual realizado para as enzimas cruzaina e CPB2.8



Legenda: figura representando a triagem virtual realizada para as enzimas CPB2.8 e cruzaina. Banco de dados inicial de 496.442 compostos. Após triagem farmacofórica foram obtidos 369 e 225 compostos para a cruzaina e CPB2.8, respectivamente.

Após a busca por moléculas que apresentassem características complementares aos modelos farmacofóricos, um estudo de ancoramento molecular foi realizado a fim de refinar a triagem e melhor avaliar a complementariedade com o modelo farmacofórico e com o sítio ativo da enzima alvo. Com este estudo buscamos excluir os compostos que não apresentem as características de interação adequadas de um *hit*. Esta etapa ainda se encontra em execução, e espera-se selecionar, após o final, um número de compostos factível para serem avaliados experimentalmente.

## 6. CONCLUSÕES

Foi realizado neste trabalho a construção do modelo da enzima CPB2.8 de *L. mexicana*, por modelagem comparativa. O modelo construído foi refinado por simulação de dinâmica molecular. As validações realizadas tanto do modelo da proteína construído quanto do modelo refinado por dinâmica molecular; demonstraram que o modelo apresenta qualidade e robustez suficiente para ser utilizado em estudos futuros. Para isso, nos baseamos, por exemplo, no gráfico de Ramachandran que sugere apenas o resíduo de Gly12 como *outlier*, sendo que é um resíduo permitido nessa região por não conter cadeia lateral volumosa (VERLI, 2014). Outro resultado importante, é a estabilização do modelo após 80 ns de simulação. Com o modelo de CPB2.8 construído, este foi utilizado em estudos de campos de interação molecular e posterior construção do modelos farmacofórico, juntamente com a enzima cruzaina.

Os modelos foram construídos com base em dados da literatura que descrevem pontos importantes para a interação entre ligantes e os sítios catalíticos de ambas as enzimas, e também pelas características encontradas nos campos de interação molecular, os quais sugeriram regiões com características físico-químicas importantes para complementariedade entre ligante e receptor. Assim, os modelos são compostos por: dois pontos de interação hidrofóbica, dois pontos doadores de ligação de hidrogênio e um ponto acceptor de ligação de hidrogênio (CPB2.8); e dois pontos de interação hidrofóbica, um ponto acceptor de ligação de hidrogênio e um ponto doador de ligação de hidrogênio (cruzaina).

O modelo farmacofórico da enzima cruzaina foi validado por curva ROC e apresentou o valor de AUC de 61%, considerado assim, adequado para ser utilizado nos estudos de triagem virtual.

O modelo farmacofórico da enzima CPB2.8 de *L. mexicana* não pode ser validado uma vez que não há dados na literatura sobre o real modo de ligação dos inibidores e se o sítio ativo em estudo é o mesmo em que os compostos atuam, por esse motivo, o estudo será validado por meio de avaliação experimental.

A abordagem de triagem virtual foi realizada partindo-se de 446.492 compostos que após estudos de triagem virtual resultou na seleção de 369 compostos para a enzima cruzaina e 225 compostos para a enzima CPB2.8.

O ancoramento molecular dos compostos obtidos por triagem virtual foi realizado e está em etapa de análise para obtenção de um número factível de compostos para seguir com as etapas de avaliação experimental.

Contudo, conclui-se que o trabalho foi de grande valia para o aprendizado visto as várias técnicas utilizadas. Foram obtidos resultados satisfatórios uma vez que todos os modelos construídos foram validados, com exceção do farmacóforo de CPB2.8, e a etapa de triagem virtual foi realizada e concluída, adequadamente. Assim, os composto selecionado podem ser considerados um ponto de partida na busca de candidatos a agentes antiparasitários contra a doença de Chagas e leishmanioses.

## REFERÊNCIAS

- AERTS, C. et al. Are public-private partnerships the solution to tackle neglected tropical diseases? A systematic review of the literature. **Health Policy**, v. 7, p. 745-54, 2017.
- AGUIRRE, G. et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.12, p. 4885-4893, 2004.
- AGUIRRE, G. et al. New potent 5-nitrofuryl derivatives as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* growth.3D-QSAR (CoMFA) studies.**European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 457-466, 2006.
- ALVES, L.C. et al. Substrate specificity of recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, p. 1-9, 2001a.
- ALVES, L.C. et al. Analysis of the S<sub>2</sub> subsite specificities of the recombinant cysteine proteinases CPB of *Leishmania Mexicana*, and cruzain of *Trypanosoma cruzi*, using fluorescent substrates containing non-natural basic amino acids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 117, p. 137-143, 2001b.
- ALVES, L.C. et al. S<sub>1</sub> subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzaina, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 1206-1212, 2001c.
- ANDREOLLO, N. A.; MALAFAIA, O. Os 100 anos da doença de chagas no Brasil. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 22, p. 189-191, 2009.
- BAKER, D.; SALI, A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. **Science**, v. 294, p. 93-96, 2001.
- BARR, S.C. et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 49, p. 5160-5161, 2005.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. **Química Medicinal: as bases moleculares da terapêutica**. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BENTO, A. P. et al. The ChEMBL bioactivity database: an update. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D1083-1090, 2014.
- BERTI, P. J.; STORER, A. C. Alignment/Phylogeny of the Papain Superfamily of Cysteine Proteases. **Journal of Molecular Biology**, v. 246, p. 273-283, 1995.
- BLAU, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 142-151, 2013.
- BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazide Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 142-150, 2010.
- BRACK, K. et al. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 6404-6410, 2008.
- BRYANT, C. et al. Novel non-peptidic vinylsulfones targetin the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 6218-6221, 2009.
- BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resitance**, v. 2, p. 236-242, 2012.

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti- *Trypanosoma cruzi* agentes: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48-59, 2014.

CAZZULO, J. J. et al. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. Absence of phosphorylated mannose residues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 38, p. 41-48, 1990.

CAZZULO, J. J.; STOKA, V.; TURK, V. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, p. 1143-1156, 2001.

CDC – Centers For Disease and Control. **Neglected Tropical Disease**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/index.html>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018.

CERQUEIRA, N. M. F. S. A. et al. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 582, p. 56-67, 2015.

CHEN, Y. T. et al. Synthesis of macrocyclic trypanosomal cysteine protease inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5860-5863, 2008.

CLAYTON, J. Chagas Disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, p. S12-S15, 2010.

COOMBS, G. H. Proteinases of *Leishmania mexicana* and other flagellate protozoa. **Parasitology**, v. 84, p. 149-155, 1982.

COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Parasite proteinases and amino acid metabolism: possibilities for chemotherapeutic exploitation. **Parasitology**, v. 114, p. S61 -S60, 1997.

COPELAND, R. A. Why enzymes as drug targets? In: COPELAND, R. A. (Ed) **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists**. 2. ed. New Jersey:John Wiley & Sons, Inc., 2013. p. 1-5.

CORNELL, W. D. et al. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, p. 5179-5197, 1995.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 286-296, 2012.

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

COURA, J. R; VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, p. S6-S7, 2010.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1478-1483, 2011.

DEL NERY, E. et al. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 25713-25718, 1997.

DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1471-1477, 2011.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. S13-S22, 2007.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.

DINIZ, L. F. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-8, 2013.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. **Doenças Negligenciadas**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/contexto.html>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018a.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. **Doença de Chagas**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.html>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018b.

DNDi – Drugs for Neglected Disease initiative. **Leishmanioses**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/leishmanioses.html>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018c.

dos REIS, F. C. G. et al. The substrate specificity of cruzipain2, a cysteine protease isoform from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 259, p. 215-220, 2006.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites and Vectors**, v. 5, p. 1-12, 2012.

DOYLE, P. S. et al. A Cysteine Protease Inhibitor Cures Chagas' Disease in an Immunodeficient-Mouse Model of Infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 51, p. 3932-3939, 2007.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DURRANT, J. D.; McCAMMON, J. A. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC Biology**, v. 9, p. 1-9, 2011.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. An Insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas Disease. **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, v. 2, p. 19-51, 2007.

ENGEL, J. C. et al. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 188, p. 725-734, 1998.

ESPÍNDOLA, J.W.P. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 818-835, 2015.

FDA – U.S. Food and Drug Administration. **FDA approves first U.S. treatment for Chagas disease**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm573942.htm>>. Acesso em: 04 de Abril de 2018.

FERREIRA, R. S. et al. Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationships of Potent Noncovalent and Nonpeptidic Cruzain Inhibitors as Anti-*Trypanosoma cruzi* Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 2380-2392, 2014.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Medicinal Chemistry Approaches to Neglected Diseases Drug Discovery. **Journal of Modern Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 20-31, 2014.

FERREIRA, R. S.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, p. 1770-1778, 2011.

FONSECA, N. C. et al. Synthesis of a Sugar-Based Thiosemicarbazone Series and Structure-Activity Relationship versus the Parasite Cysteine Proteases Rhodesain, Cruzain, and *Schistosoma mansoni* Cathepsin B1. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, p. 2666-2677, 2015.

GASTEIGER, J. Chemoinformatics: a new field with a long tradition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 57-64, 2006a.

GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemometrics Intelligent Laboratory Systems**, v. 82, p. 200-209, 2006b.

GEA, S. et al. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cysteine protease in the host-parasite interplay. **Inmunología**, v. 25, p. 225-238, 2006.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, v. 6, p. 1603-1611, 1997.

GRANT, M. A. Protein structure prediction in structure-based ligand design and virtual screening. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 12, p. 940-960, 2009.

GRAYSON, M. Chagas disease. **Nature**, v. 465, p. S3-S3, 2010.

GRUTSCH, S. et al. Ligand Binding Modulates the Structural Dynamics and Compactness of the Major Birch Pollen Allergen. **Biophysical Journal**, v. 107, p. 2972-2981, 2014.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Planejamento de fármacos, biotecnologia, e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Química Nova**, v. 24, p. 81-98, 2010.

GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Structure- and Ligand-based drug approaches for neglected tropical disease. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, p. 1857-1866, 2012.

HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7826-7835, 2010.

HEVENER, K. E. et al. Validation of Molecular Docking Programs for Virtual Screening against Dihydropteroate Synthase. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, p. 444-460, 2009.

HÖLTJE, H. -D. et al. Introduction to Comparative Protein Modeling. In: HÖLTJE, H. -D. et al. (Ed) **Molecular Modeling: Basic principles and applications**. 1. ed. Alemanha: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2008. p. 111-115.

HOPFINGER, A. J. Computer-assisted drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 28, p. 1133-1139, 1985.

HUANG, N.; SHOICHET, B. K.; IRWIN, J. J. Benchmarking Sets for Molecular Docking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 6789-6801, 2006.

IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 45, p. 177-182, 2005.

IRWIN, J. J. et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, p. 1757-68, 2012.

ITAI, A. et al. Computer-assisted new lead design In: COHEN, N. C. (ED.). **Guidebook on molecular modeling drug design**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 100-101.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.

JAISHANKAR, P. et al. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 624-628, 2008.

KALYAANAMOORTHY, S.; CHEN, Y. P. P. Modelling and enhanced molecular dynamics to steer structure-based drug Discovery. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 114, p. 123-136, 2014.

JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 11225-11236, 1996.

KRÜGER, D. M.; EVERS, A. Comparison of Structure- and Ligand-Based Virtual Screening Protocols Considering Hit List Complementarity and Enrichment Factors. **ChemMedChem**, v. 5, p. 148-158, 2010.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**, 2.ed. Londres: Prentice Hall, 2001. 744p.

LINDORFF-LARSEN, K. et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins**, v. 78, p. 1950-1958, 2010.

MACALINO, S. J. et al. Role of computer-aided drug design in modern drug discovery. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, p. 1686-1701, 2015.

MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 90-100, 2009.

MARTÍNEZ, L.; BORIN, I. A.; SKAF, M. S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. In: Morgon, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**. 1 ed. São Paulo: Livraria da Física, 2007. Cap 12, p. 413-452.

MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnósticos. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 11, p. 7-31, 2003.

McGRATH, M. E. et al. The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 251-259, 1995.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Quarterly Journal of Nuclear Medicine**, v. 106, p. 1-8, 2013.

MacKERELL, J. A. D. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. **Journal of Physical Chemistry**, v. 102, p. 3586-3616, 1998.

McKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 639-644, 1999.

MOLINA, J. et al. Activities of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) against Drug Resistant Strains of the Protozoan Parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 150-155, 2000.

MOTTRAM, J. C.; BROOKS, D. R.; COOMBS, G. H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p. 455-460, 1998.

MOTTRAM, J.C. et al. A developmentally regulated cysteine proteinase gene of *Leishmania mexicana*. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 1925-1932, 1992.

MOTTRAM, J. C. et al. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 6008-6013, 1996.

MOTTRAM, J. C. et al. The Multiple *cpb* Cysteine Proteinase Genes of *Leishmania mexicana* Encode Isoenzymes That Differ in Their Stage Regulation and Substrate Preferences. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 14285-14293, 1997.

- MUNIZ, J. R. C. **Aplicação da bioinformática nos estudos dos genes e enzimas envolvidos na síntese da gomafastidiana produzida pela *Xylela fastidiosa***. 2003. 124p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.
- MYSINGER, M. M. et al. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 6582-6594, 2012.
- NAMBA, A. M.; da SILVA, V. B.; da SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, p. 13-24, 2008.
- NETO, V. A.; PASTERNAK, J. Centenário da Doença de Chagas. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 381-382, 2009.
- OLSSON, T.; OPREA, T. I. Cheminformatics: a tool for decision-makers in drug discovery. **Current Opinion in Drug Discovery and Development**, v. 4, p. 308-313, 2001.
- PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Chagas Disease**. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743)>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018a.
- PAHO - PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754)>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018b.
- PEDRIQUE, B. et al. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): a systematic assessment. **Lancet Glob Health**, v. 1, n. 6, p. e371-9, 2013.
- PEREIRA NUNES, M. C. et al. Chagas Disease: an Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 62, p. 767-776, 2013.
- REY, L. Leishmaníases Cutâneas e Mucocutâneas do Novo Mundo. In: REY, L. (Ed) **Bases da Parasitologia Médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p. 62-69.
- ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, p. 269-276, 1990.
- SAJID, M. et al. Cruzain. The path from target validation to the clinic. In: ROBINSON, M. W.; DALTON, J. P. **Cysteine Proteases of Pathogenic Organisms**. New York: Landes Bioscience and Spriger Science+Business Media, 2011. cap. 7, p. 100-115.
- SAJID, M.; McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.
- SALI A. et al. Evaluation of comparative protein modeling by MODELLER. **Proteins**, v. 23, p. 318-26, 1995.
- SALSBURY, F. R. J. Molecular dynamics simulations of protein dynamics and their relevance to drug discovery. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 738-744, 2010.
- SANDERSON, S. J. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **Biochemical Journal**, v. 347, p. 383-388, 2000.
- SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos (Recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**, v. 25, p. 505-512, 2002.
- SERAFIM, R. A. M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of hybrid bioisoster derivatives of *N*-acylhydrazones and furoxan groups with potential and selective anti- *Trypanosoma cruzi* activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 82, p. 418-425, 2014.

SERVEAU, C. et al. Investigation of the substrate specificity of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*, through the use of cystatin- derived substrates and inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 313, p. 951-956, 1996.

SHEN, Y.; BAX, A. Homology modeling of larger proteins guided by chemical shifts. **Nature Methods**, v. 12, p. 747-750, 2015.

SILES, R. et al. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of chagas' disease. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 4405-4409, 2006.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p. 485-497, 2012.

SÖDING, J.; BIEGERT, A.; LUPAS, A. N. The HHpred Interactive Server for Protein Homology Detection and Structure Prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. W244-W248, 2005.

TROSSINI, G. H. G. **Antichagásicos potenciais: busca racional de compostos com ação seletiva pela cruzaina**. 2008. 321 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TROSSINI, G. H. G. et al. Cruzain inhibition by hydroxymethylnitrofurazone and nitrofurazone: investigation of a new target in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 62-67, 2010.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance current limitation and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, p. 55-68, 2010

van der SPOEL, D. et al. **GROMACS User Manual**, version 4.6.5, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org), 2013.

van GUNSTEREN, W. F. et al. **Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide**, Vdf Hochschulverlag AG an der ETH Zürich, Zürich, Switzerland, 1996, p. 1-1042.

VERLI, H. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. 1. ed. São Paulo: SBBq, 2014.

VERMELHO, A. B. et al. *Trypanosoma cruzi* peptidases: an overview. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 120-131, 2010.

VITAL, D. G.; ARRIBAS, M.; TROSSINI, G. H. G. Molecular Modeling and Docking Application to Evaluate Cruzain Inhibitory Activity by Chalcones and Hydrazides. **Letters in Drug Design & Discovery**, v.11, p. 249-255, 2014.

WERMUTH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. London: Academic Press, 2008.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tropical diseases**. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/tropical\\_diseases/en/](http://www.who.int/topics/tropical_diseases/en/)>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018a.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018b.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2018c.

WIGGERS, H. J. et al. Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, p. 1-11, 2013.

**ANEXO I**  
**REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO SANDUÍCHE**

## AI.1 REALIZAÇÃO DO ESTÁGIO SANDUÍCHE

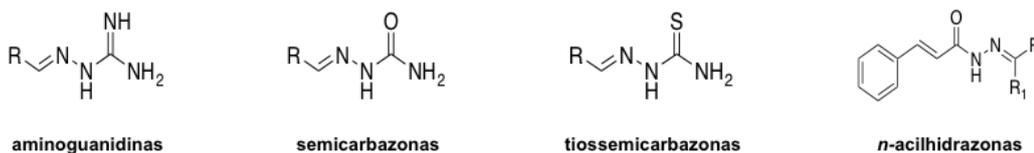
Durante o período de Março de 2017 a Setembro de 2017, foi realizado o estágio sanduíche na *Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* na Universidade da Califórnia, San Diego sob supervisão do Professor Jair Lage de Siqueira-Neto e financiamento da agência de fomento FAPESP projeto nº 2017/01181-0.

O título do trabalho realizado foi: “*Virtual Screening (VS) and High-Throughput Screening (HTS) Integration in Discovery of new drugs against neglected tropical diseases (NTDs)*”

Neste trabalho foi utilizada a estratégia de triagem fenotípica na identificação de compostos. O intuito foi avaliar uma série de compostos sintetizados pelo grupo do Professor Gustavo Trossini contra a enzima cruzaina e contra a forma infectante tripomastigota do *T. cruzi*.

## AI.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os ensaios foram realizados no laboratório do Prof. Jair Lage Siqueira-Neto. Os compostos avaliados foram sintetizados no laboratório do Prof. Gustavo Trossini. A seguir, o esqueleto dos compostos testados (Figura AI.1) :



### AI.2.1 Expressão da enzima cruzaina

O vetor de expressão da enzima cruzaina foi gentilmente cedido pelo técnico de laboratório do Dr. James McKerrow's, Ken Hirata (UCSD). A enzima na forma recombinante foi expressada e purificada em *Pichia pastoris*.

#### AI.2.1.1 Preparo do meio de expressão: extrato de levedura com peptone e dextrose

Foi preparado 1L de meio de extrato de levedura com peptone e dextrose. O extrato de levedura (10 g) e a peptona (20 g) foram dissolvidos em 900 mL de água deionizada e adicionada em um frasco. O frasco contendo o extrato e a peptona foi autoclavado por 20 minutos em um ciclo líquido. Após, foi adicionado em banho de gelo. Enquanto o meio com extrato de levedura era resfriado, foi preparado 20% de dextrose, adicionando 20 g de D-glucose em 100 mL de água deionizada e foi filtrado em filtro estéril. Uma vez que o meio de extrato de levedura estava resfriado, foi adicionado 100 mL de dextrose (20%). O meio de extrato de levedura contendo peptona e dextrose foi acondicionado em um Erlenmeyer de 1 L e foi estocado a 4 °C.

#### Al.2.1.2 Inóculo de *Pichia pastoris*

Foi retirado do Erlenmeyer contendo o meio de extrato de levedura, 5 ml e foi adicionado em um tubo tipo falcon de 14 mL, foi adicionado 5  $\mu$ L of Zeocin™, que é um antibiótico utilizado para selecionar somente as colônias de *Pichia pastoris* que foram transformadas com o vetor da enzima. E o inóculo de *Pichia pastoris* foi realizado no tubo falcon. O tubo foi colocado em um agitador por 3 dias a 28 °C para o crescimento da *Pichia pastoris* contendo o gene de expressão da cruzaina. Após os três dias, o tubo falcon foi retirado do agitador e o inóculo foi ressuscitado. O meio contendo o extrato de levedura que foi estocado, foi dividido em dois Erlenmeyer de 500 mL cada um e 2.5 mL do inóculo foram adicionado em cada Erlenmeyer. Cada um dos Erlenmeyer contendo o meio e o inóculo foi adicionado no agitador por 24 horas a 28 °C.

#### Al.2.1.3 Meio de Lise Celular

Após as 24hos dois Erlenmeyer foram centrifugados por 20 minutos a 6.000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado em 2 L de Meio Mínimo Tamponado com adição de Metanol (BMM), que é um meio utilizado para a realizar a lise das células contendo a cruzaina recombinante. O BMM com as células ressuscitadas foi dividido em 4 Erlenmeyer de 500 mL cada e foi colocado em um agitador por 2 dias a 28 °C.

#### Al.2.1.4 Purificação da cruzaina

Após os dois dias, o quarto Erlenmeyer foram centrifugados por 20 minutos a 6.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente nas mesmas condições com o intuito de limpar toda a solução de algum resto de *Pichia pastoris* que possa ter ficado no sobrenadante.

A solução contendo a cruzaina foi filtrada de forma estéril, o filtro foi trocado a cada 500 mL. A solução filtrada foi armazenada a 4 °C para posterior purificação em Cromatografia Líquida de Proteína Rápida (FPLC).

### **AI.2.2 Ensaio de Inibição da cruzaina**

A cruzaina recombinante purificada (0.5 nM) foi diluída em 0.1 M de tampão acetato de sódio (pH 5.5) na presença de 0.1% Triton X-100 e foi incubada com ditioneitol (DTT - 10mM) a 37 °C por 10 minutos para ativação da proteína.

Os compostos sintetizados pelo grupo do Prof Gustavo Trossini (86 compostos) foram adicionados em placas contendo 96 poço em dose-única de 50 µM. A cruzaina (99 µL) foi adicionada aos compostos e a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. O controle foi realizado com 1% de DMSO, sendo que 0% de inibição confirma que o DMSO não interferiu no ensaio, uma vez que os compostos foram solubilizados no mesmo. O ensaio foi realizado em um leitor de placa EnVision™ Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer); a atividade enzimática foi medida pela fluorescência remanescente emitida pelo agente (aminometilcumarina) presente no substrato Z-Phe-Arg-AMC por 75 minutos. Todos os dados foram coletados e analisados no GraphPad Prism 5.0 utilizando uma análise de regressão não-linear.

### **AI.2.3 Ensaio de Inibição de Crescimento Parasitário**

O ensaio fenotípico foi realizado para os 86 compostos para verificar a atividade anti-*T. cruzi*. Neste ensaio, a cepa Ca-I/72 da forma infectiva tripomastigota do *T. cruzi* foi coletada após 4-7 dias de pós-infecção em células de linhagem C2C12 (mioblastos). As células C2C12 foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco MEM (DMEM) enriquecido com 4.5 g/L D-glucose, 2 mM glutamina e 110 mg/L piruvato de sódio, 5% Soro fetal bovino e 1% penicilina-estreptomicina. Os compostos foram adicionados em placa contendo 384 poços utilizando um equipamento ATS Gen 4 Plus – Acoustic Transfer System (EDC Biosystems) em 6 concentrações iniciais (40 µM sendo diluído mais 2 vezes em DMSO). Cada poço recebeu 500 células C2C12 e 7.500 parasitas tripomastigotas em um volume final de 50 µL.

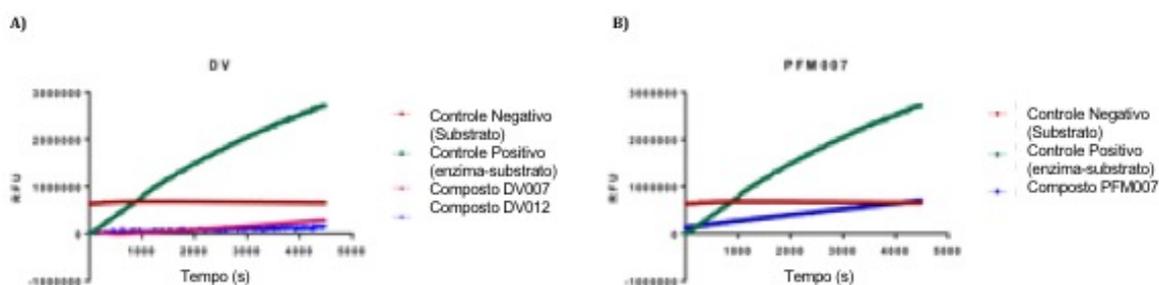
As placas contendo as células, parasitas e compostos, foram incubadas por 72 horas a 37 °C. Após esse período, as placas foram fixadas em 30 µL da mistura: 4% de paraformaldeído (PFA) em tampão fosfato salino (PBS), as placas foram incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Cada poço das placas foi aspirado para retirar todo o líquido de dentro. Foi adicionado 15 µL de uma solução de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol (5 µg/mL)) para revelar os ácidos nucleicos das células e dos parasitas e foi incubado por 2 horas em temperatura ambiente sem luz. Após este processo, as placas foram lidas em um microscópio automatizado, ImageXpress Micro XL (Molecular Devices), para quantificar as células e os parasitas.

## AI.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### AI.3.1 Ensaio de Inibição da cruzaina

Os compostos testados em dose-única (50  $\mu\text{M}$ ) no ensaio de inibição da cruzaina foram obtidos por metodologia de síntese baseada em compostos já descritos na literatura (BLAU et al., 2013; BORCHHARDT et al., 2009; DU et al., 2002; FONSECA et al., 2015). Neste ensaio, 86 compostos foram testados e só foram considerados relevantes aqueles que apresentaram porcentagem de inibição maior que 50%. Levando em consideração essa margem de inibição, três compostos apresentaram inibição acima de 50%; dois derivados de tiossemicarbazonas (81% and 90%) e um derivado de chalcona (55%) (Figure AI.2).

Figure AI.2 – Resultados de Inibição da cruzaina



A) Curva de atividade de inibição da cruzaina (tempo x unidade de fluorescência - RFU) para os compostos derivados de tiossemicarbazonas. Verde: Controle Positivo – cruzaina na presença de substrato. Vermelho: Controle Negativo: substrato sem cruzaina. Magenta: Compostos DV007 mostrou 81% de inibição. Azul: Composto DV012 com atividade de inibição de 90%. B) Curva de inibição do compostos derivado de chalcona. Em verde e vermelho os mesmos controles usados em 1A, e em azul o composto PFM007 com 55% de inibição.

Três dos 86 compostos apresentaram atividade frente à cruzaina. Dois desses compostos são derivados de tiossemicarbazona e inibiram a enzima em 80% a 50  $\mu\text{M}$ . Esta classe de compostos já demonstrou ser interessante em ensaio de inibição da

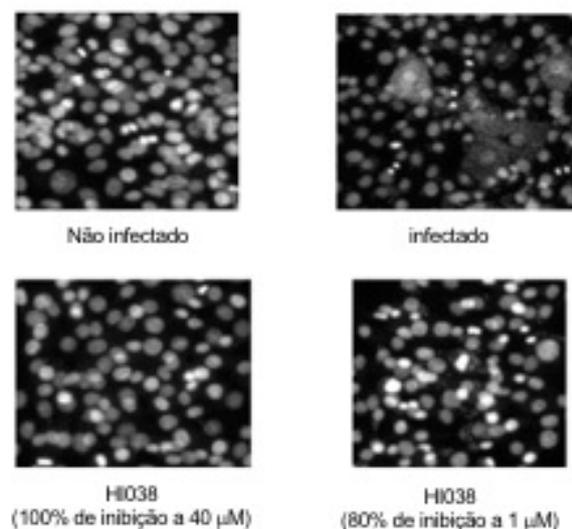
enzima cruzaina, sugerindo ser um bom esqueleto a ser otimizado em busca de novos candidatos à antichagásicos (DU et al., 2002; FONSECA et al., 2015; VITAL et al., 2016).

### AI.3.2 Ensaio Fenotípico

Os 86 compostos foram testados em 6 concentrações (40  $\mu\text{M}$  – 1  $\mu\text{M}$ ) contra a forma infectiva do *T. cruzi* ( cepa Ca-I/72). Dois dos 86 compostos apresentaram atividade de inibição do crescimento parasitário acima de 80% (redução de 80% dos parasitas quando comparado ao controle) e esta porcentagem de inibição se manteve até a concentração de 1  $\mu\text{M}$ .

O composto com melhor resultado foi o HI038 apresentando 100% de redução da carga parasitária a 40  $\mu\text{M}$  e 80% a 1  $\mu\text{M}$ , na figura AI.3 é possível visualizar a taxa de morte parasitária até 1  $\mu\text{M}$  de composto.

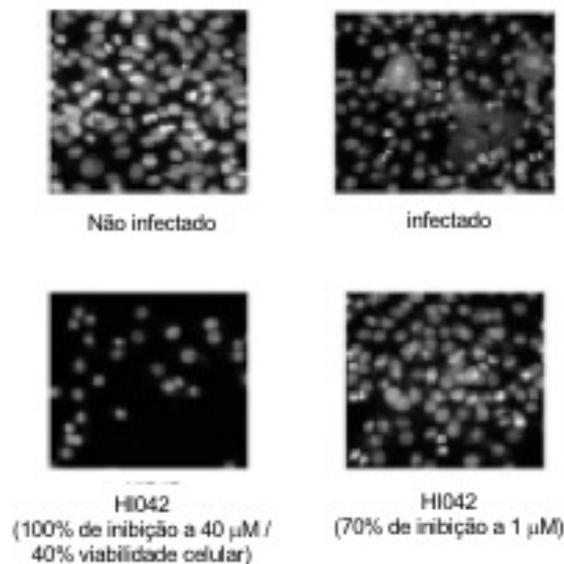
**Figura AI.3** – Inibição de Crescimento Parasitário – Composto HI038



Controles não infectado e infectado estão na imagem de cima. É possível comparar com o composto HI038 em concentrações de 40  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ , imagens de baixo. Porcentagem de Inibição para ambas as concentrações (100% e 80%) e viabilidade celular (100%).

Outro composto, HI042, foi ativo no ensaio fenotípico apresentando 100% de inibição do crescimento parasitário a 40  $\mu\text{M}$ , mas nesta concentração o composto diminuiu a viabilidade celular para 40%. Este resultado também era esperado, uma vez que essa classe de compostos apresenta um grupamento nitro que já foi descrito como tóxico (AGUIRRE et al., 2004; DIAS et al., 2009; MORENO et al., 1983; PATTERSON, WYLLIE, 2014). Apesar disto, o composto apresentou a 1  $\mu\text{M}$ , 70% de inibição parasitária (Figura AI.4).

**Figura AI.4 – Inibição de Crescimento Parasitário – Composto HI042**



Controles não infectado e infectado estão na imagem de cima. O composto HI042 está nas imagem de baixo, a porcentagem de Inibição para ambas as concentrações (100% e 70%) e viabilidade celular (40% e 100%, respectivamente).

Este resultado se mostrou satisfatório mesmo com a viabilidade celular, pois como apresentado mesmo em baixa concentração apresentou atividade. Mais estudos devem ser realizados com o intuito de otimizar esses fármacos e substituir o grupamento nitro e diminuir a toxicidade.

Os ensaios fenotípicos ainda estão sendo realizados pelo grupo do Prof Jair a fim de verificar em qual estágio da infecção os compostos atuam, assim como os ensaios *in vivo* em modelos de camundongos.

#### **AI.4 CONCLUSÕES**

De 86 compostos testados, três foram ativos contra a enzima cruzaina, sendo que dois desses compostos pertencem a classe das tiossemicarbazonas já descritas como inibidoras. No ensaio de inibição de crescimento parasitário, dois compostos foram ativos diminuindo a carga parasitária em mais de 80%.

Os compostos que foram ativos na enzima, não foram ativos no parasita e vice-versa, isso mostra que otimizações serão necessárias para avaliar o motivo de tal resultado. Porém, os resultados encontrados foram satisfatórios, visto que tanto na enzima quanto no parasita a inibição foi de mais de 50%, indicando que com otimizações adequadas podemos chegar a um composto promissor.

## REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, G. et al. In vitro activity and mechanism of action against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* of 5-nitrofuryl containing thiosemicarbazones. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.12, p. 4885-4893, 2004.
- BLAU, L. et al. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 142-151, 2013.
- BORCHHARDT, D. M. et al. Biochemical Evaluation of a Series of Synthetic Chalcone and Hydrazone Derivatives as Novel Inhibitors of Cruzain from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 142-150, 2010.
- DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p. 2444-2457, 2009.
- DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.
- FONSECA, N. C. et al. Synthesis of a Sugar-Based Thiosemicarbazone Series and Structure-Activity Relationship versus the Parasite Cysteine Proteases Rhodesain, Cruzain, and Schistosoma mansoni Cathepsin B1. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, p. 2666-2677, 2015.
- MORENO, S. N. et al. Generation of free radicals from metronidazole and other nitroimidazoles by *Trichomonas foetus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 258, p. 4051-4054, 1983.
- PATTERSON, S.; WYLLIE, S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. **Trends in Parasitology**, v. 30, p. 289-298, 2014.
- VITAL, D. G. et al. Application of bioisosterism in design of the semicarbazone derivatives: A theoretical and experimental study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 35, p. 1-62, 2016.

**ANEXO II**  
**Ficha do Aluno**

**Janus** - Sistema Administrativo da Pós-



**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Documento sem validade oficial**  
**FICHA DO ALUNO**

**9138 7836029/2 - Drielli Gomes Vital Fujii**

<b>Email:</b>	driellivital@usp.br
<b>Data de Nascimento:</b>	29/08/1987
<b>Cédula de Identidade:</b>	RG - 33.448.624-5 - SP
<b>Local de Nascimento:</b>	Estado de São Paulo
<b>Nacionalidade:</b>	Brasileira
<b>Graduação:</b>	Farmacêutico - Universidade de Mogi das Cruzes - São Paulo - Brasil - 2009
<b>Mestrado:</b>	Mestra em Ciências - Área: Insumos Farmacêuticos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013
<b>Curso:</b>	Doutorado
<b>Programa:</b>	Fármaco e Medicamentos
<b>Área:</b>	Insumos Farmacêuticos
<b>Data de Matrícula:</b>	09/12/2013
<b>Início da Contagem de Prazo:</b>	09/12/2013
<b>Data Limite para o Depósito:</b>	09/04/2018
<b>Orientador:</b>	Prof(a). Dr(a). Carlota de Oliveira Rangel Yagui - 09/12/2013 até 21/01/2014. Email: corangel@usp.br
<b>Orientador:</b>	Prof(a). Dr(a). Gustavo Henrique Goulart Trossini - 22/01/2014 até o presente. Email: trossini@usp.br
<b>Proficiência em Línguas:</b>	Inglês, Aprovado em 09/12/2013
<b>Prorrogação(ões):</b>	120 dias Período de 09/12/2017 até 08/04/2018
<b>Data de Aprovação no Exame de Qualificação:</b>	Aprovado em 18/02/2016
<b>Data do Depósito do Trabalho:</b>	
<b>Título do Trabalho:</b>	
<b>Data Máxima para Aprovação da Banca:</b>	
<b>Data de Aprovação da Banca:</b>	
<b>Data Máxima para Defesa:</b>	
<b>Data da Defesa:</b>	
<b>Resultado da Defesa:</b>	
<b>Histórico de Ocorrências:</b>	Primeira Matrícula em 09/12/2013 Prorrogação em 27/10/2017

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga			Exc.	Situação		
				Horária	Cred.	Freq.				
ICB5731-	Ferramentas de Bioinformática para Análise de Estruturas de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	05/05/2014	15/06/2014	60	4	89	B	N	Concluída	
	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa									
	Atividade de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina									
FBF0416	Química Farmacêutica <sup>do</sup> II, ministrada aos alunos de graduação do Programa curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	02/02/2015	30/06/2015	-	1	100	A	-	-	
FBF5818-	Tópicos Avançados em Fármacos e Medicamentos – Fundamentos e Aplicações de Análises Multivariadas no Planejamento de Fármacos	15/06/2015	21/06/2015	30	2	100	A	N	Concluída	
ICB5747-	Proteômica: Um Link entre Biologia, Química, Farmácia e Medicina (Parte I) (Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo)	27/07/2015	09/08/2015	60	4	100	A	N	Concluída	
FBF5822-	Tópicos Avançados em Fármaco e Medicamentos (Calorimetria e Termodinâmica no Desenho de Novos Fármacos)	02/09/2015	08/09/2015	30	2	100	A	N	Concluída	
FBF5805-	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	10/03/2016	19/05/2016	90	6	90	A	N	Concluída	
FBF5779-	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	08/04/2016	09/06/2016	90	6	95	A	N	Concluída	
FBF5824-	Introdução à Modelagem Molecular como Ferramenta no Estudo e Desenvolvimento de Moléculas Bioativas	04/07/2016	24/07/2016	90	6	100	A	N	Concluída	

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos	
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese		
<b>Disciplinas:</b>	0		20	31
<b>Estágios:</b>				
<b>Total:</b>	0		20	31

**Créditos Atribuídos à Tese: 167**

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão Coordenadora de Programa, em Sessão de 08/09/2015.

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2018

**Impresso em:** 05/04/2018 22:29:55

**ANEXO III**  
**Currículo Lattes**



## Drielli Gomes Vital Fujii

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/0328848090156183>

Última atualização do currículo em 15/01/2018

### Resumo informado pelo autor

Possui Graduação em Farmácia pela Universidade de Mogi das Cruzes, concluída em Dezembro de 2008. Mestrado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), curso FÁRMACO e Medicamentos, concluído em Novembro de 2013. Atualmente é Doutoranda na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), curso FÁRMACO e Medicamentos.

(Texto informado pelo autor)

### Dados pessoais

**Nome** Drielli Gomes Vital Fujii

**Filiação** Luiz Gomes Vital e Ivone Dos Santos Vital

**Nascimento** 29/08/1987 - Mogi das Cruzes/SP - Brasil

**Carteira de Identidade** 33448624SSP - SP26/01/2009

**CPF** 348.290.478-28

### Formação acadêmica/titulação

**2013** Doutorado em FÁRMACO e Medicamentos  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
período sanduíche em Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences  
(Orientador : Professor Jair Lage de Siqueira-Neto)  
Título: APLICAÇÃO DE PLANEJAMENTO BASEADO NA ESTRUTURA DO RECEPTOR NA BUSCA DE INIBIDORES DE CISTEÍNO- PROTEASES PARASITARIAS (T. cruzi) e CPB (Leishmanioses)

Orientador: Gustavo Henrique Goulart Tróssini  
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**2012 - 2013** Mestrado em FÁRMACOS e Medicamentos  
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil  
Título: Planejamento, síntese e avaliação biológica de análogos bioisostéricos da nitrofurazona : variações de anéis (pirrol e 4-dimetilaminobenzil) e cadeias laterais (semicarbazona, tiossemicarbazona e aminoguanidina), Ano de obtenção: 2013

Orientador: Gustavo Henrique Goulart Tróssini  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

**2005 - 2008** Graduação em Farmácia  
Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Mogi Das Cruzes, Brasil  
Título: Perfil Cromatográfico do Extrato Metanólico da Plantago major L. E Separação de Frações  
Orientador: Guilherme Costa Matsutani

### Formação complementar

**2015 - 2015** Prospecção de novos fármacos - abordagens teórica e experimental. . (Carga horária: 4h).  
38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil

**2014 - 2014** Curso de curta duração Introdução à Química computacional. (Carga horária: 4h).  
Universidade Federal do ABC, UFABC, Santo Andre, Brasil

**2009 - 2009** Curso de curta duração Aplicação de Injetáveis. (Carga horária: 8h).  
Becton Dickinson, BD, Brasil

**2006 - 2006** Curso de curta duração Coleta de Material Biológico. (Carga horária: 8h).  
Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Mogi Das Cruzes, Brasil

### Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP - FCF-USP

**Vínculo institucional**

**2014 - 2014** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiária PAE , Carga horária: Parcial

Outras informações:  
Estagiária no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino na disciplina de Química Farmacêutica

**2013 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiária PAE , Carga horária: 40, Dedicção exclusiva

Outras informações:  
Estagiária no Programa de Aperfeiçoamento de Ensino na disciplina de Química Farmacêutica

**2013 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutoranda , Carga horária: 40, Dedicção exclusiva

**2012 - 2013** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestrado , Carga horária: 40, Dedicção exclusiva

2. Universidade de Mogi das Cruzes - UMC

#### Vínculo institucional

**2008 - 2008** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio Profissionalizante , Carga horária: 30, Parcial

Outras informações:  
Estágio No Centro de Estudos Laboratoriais Farmacêuticos (CELFAFM) da Universidade de Mogi das Cruzes

**2008 - 2008** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio Profissionalizante , Carga horária: 30, Dedicção exclusiva

Outras informações:  
Estágio no Ambulatório de Especialidades da Universidade de Mogi das Cruzes na área de Análises Clínicas

3. University of California San Diego - UCSD

#### Vínculo institucional

**2017 - 2017** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Visiting Student , Carga horária: 40, Dedicção exclusiva

Outras informações:  
Bolsa BEPE- Fapesp (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior)

## Produção

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

- [doi](#) LEITE, FRANCO HENRIQUE ANDRADE; FROES, THAMIRES QUADROS; DA SILVA, SUELLEN GONÇALVES; MACÉDO DE SOUZA, EVANDRO ITALO; VITAL-FUJII, DRIELLI GOMES; GOULART TROSSINI, GUSTAVO HENRIQUE; SILVA DA ROCHA PITA, SAMUEL; CASTILHO, MARCELO SANTOS An integrated approach towards the discovery of novel non-nucleoside Leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., v. 132, p.322 - 332, 2017. [JCR](#)
- [doi](#) MELLO, JULIANA DA FONSECA REZENDE E; GOMES, RENAN AUGUSTO; VITAL-FUJII, DRIELLI GOMES FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO; TROSSINI, GUSTAVO HENRIQUE GOULART Fragment-based drug discovery as alternative strategy to the drug development for neglected diseases. Chemical Biology & Drug Design., v.90, p.1067 - 1078, 2017. [JCR](#)
- [doi](#) Q. PANTALEÃO, SIMONE; G.V. FUJJI, DRIELLI; G. MALTAROLLO, VINÍCIUS; DA C. SILVA, DANIELLE; H.G. TROSSINI, GUSTAVO; C. WEBER, KAREN; P.B. SCOTT, LUIS; M. HONORIO, KATHIA The role of QSAR and virtual screening studies in type 2 diabetes drug discovery. Medicinal Chemistry. [JCR](#), v. 13, p.1 - 1, 2017.
- [doi](#) VITAL, DRIELLI G.; DAMASCENO, FLÁVIA; RAPADO, LUDMILA N.; SILBER, ARIEL M.; VILELLA, FILIPE S.; FERREIRA, RAFAELA S.; MALTAROLLO, VINÍCIUS G.; TROSSINI, GUSTAVO H. G. Application of bioisosterism in design of the semicarbazone derivatives: A theoretical and experimental study. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.v.35, p.1 - 62, 2016. [JCR](#)
- [doi](#) BLAU, LOREN MENEGON, RENATO FARIN TROSSINI, GUSTAVO H.G; MOLINO, JOÃO VITOR DUTRA; VITAL, DRIELLI GOMES; CICARELLI, REGINA MARIA BARRETTQ; PASSERINI GABRIELA DO BOSQUESI, PRISCILA LONGO; CHIN, CHUNG AN Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. European Journal of Medicinal Chemistry, v.67, p.142 - 151, 2013. [JCR](#)
- [doi](#) VITAL, DRIELLI GOMES; RIBAS, MARCO; GOULART TROSSINI, GUSTAVO HENRIQUE Molecular modeling and docking application to evaluate cruzain inhibitory activity by chalcones and hydrazides. Letters in Drug Design & Discovery, v.666, p.6 - 10, 2013. [JCR](#)

#### Apresentação de trabalho e palestra

- [doi](#) VITAL-FUJII, D. G. Trossini, G. H. G Application of Structure-Based Drug Design (SBDD) in search of new cruzain and CPB2.8 inhibitors 2016.(Outra, Apresentação de Trabalho)
- VITAL, D. G. MALTAROLLO, VINÍCIUS Trossini, G. H. G Comparative Modeling and Molecular Dynamic Simulation of CPB2.8: a cysteine proteinase of Leishmania mexicana 2015.(Simpósio, Apresentação de Trabalho)
- VITAL, D. G. Trossini, G. H. G. Vinicius G. Maltarollo Construção e validação da cisteino-protease de L. mexicana (CPB2.8) no bioquímico no planejamento de fármacos 2015.(Congresso, Apresentação de Trabalho)
- [doi](#) VITAL-FUJII, D. G. Ferreira, G. M; Mello, J. F. R; Gustavo H. G. Trossini Molecular dynamic simulation and pharmacophore model of parasitic cysteine proteases (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- VITAL, DRIELLI GOMES Vinicius G. Maltarollo; Flávia Damasceno; Ludmila N. Rapado; Ariel M. Silber; Felipe S. Vilella; Rafaela S. Ferreira; Gustavo H. G. Trossini Nitrofurazone bioisosters (semicarbazone, thiosemicarbazone and aminoguanidine derivatives) as antichagasic candidates 2014.(Congresso, Apresentação de Trabalho)

6. VITAL, D. G.; TROSSINI, GUSTAVO H.G. Syntheses, Molecular Modeling and Docking Studies of Nitrofurazone Analogues as Trypanomicide Candidates, 2013. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
7. VITAL, D. G.; Ferreira, E. I.; Trossini, G. H. G. MOLECULAR MODELING STUDIES OF STEREOELETRONIC PROPERTIES BY CHALCONES AND HYDRAZIDE ANTICHAGASIC CANDIDATES, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
8. VITAL, D. G.; Ferreira, E. I.; Trossini, G. H. G. Molecular Modeling Studies of Stereoelectronic Properties by Chalcones and Hydrazides Antichagasic Candidates, 2012. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
9. VITAL, D. G.; MATSUTANI, G. C. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *Plantago major* L. E SEPARAÇÃO DE FRAÇÕES, 2008. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
10. VITAL, D. G.; MATSUTANI, G. C. PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *Plantago major* L. E SEPARAÇÃO DE FRAÇÕES, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

## Eventos

### Eventos

#### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Workshop and Summer School Neglected Disease**, 2016. (Outra)  
Application of Structure-Based Drug Design (SBDD) in search of new cruzain and CPB2.8 inhibitors.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.**, 2015. (Congresso)  
Construção e validação da cisteíno-protease de *L. mexicana* (CPB2.8) como alvo bioquímico no planejamento de fármacos.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IV International Symposium on Drug Discovery**, 2015. (Simpósio)  
Comparative Modeling and Molecular Dynamic Simulation of CPB2.8: a cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*.
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **248th ACS National Meeting & Exposition**, 2014. (Congresso)  
Nitrofurazone biosesters (semicarbazone, thiosemicarbazone and aminoguanidine derivatives) as antichagasic candidates.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **III Internacional Symposium on Drug Discovery**, 2013. (Simpósio)  
Syntheses, Molecular Modeling and Docking Studies of Nitrofurazone Analogues as Trypanomicide Candidates.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **47ª Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2012. (Simpósio)  
Molecular Modeling Studies of Stereoelectronic Properties by Chalcones and Hydrazides Antichagasic Candidates.
7. Apresentação de Poster / Painel no(a) **The 6th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry - BrazMedChem**, 2012. (Simpósio)  
Molecular Modeling Studies of Stereoelectronic Properties by Chalcones and Hydrazides Antichagasic Candidates.
8. **How to Write for and Get Published in Scientific Journals**, 2012. (Outra)
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **3º Simpósio Regional de Saúde**, 2008. (Simpósio)  
Perfil Cromatográfico do Extrato Metanólico da *Plantago major* L. E Separação de Frações.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVI Semana Farmacêutica da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2008. (Simpósio)  
Perfil Cromatográfico do Extrato Metanólico da *Plantago major* L. E Separação de Frações.
11. **XV Semana Farmacêutica da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2007. (Simpósio)
12. **XIV Semana Farmacêutica da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2006. (Congresso)
13. **XIII Semana Farmacêutica da Universidade de Mogi das Cruzes**, 2005. (Congresso)

#### Organização de evento

1. TROSSINI, GUSTAVO H.G.; VITAL, D. G.; MALTAROLLO, VINÍCIUS G.; GATTI, F. M. I **Workshop de Jovens Pesquisadores em Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos**, 2015. (Outro, Organização de evento)

## Bancas

### Bancas

#### Participação em banca de trabalhos de conclusão

#### Graduação

1. Trossini, G. H. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; VITAL-FUJII, D. G. Participação em banca de Cecília Timm Wotrich. **Busca de Inibidores de dildrofolato redutase de *Schistosoma mansoni* (SmDHFR) por Planejamento de Fármacos baseado na Estrutura do Receptor**, 2016 (Farmácia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 05/04/2018 às 22:32:13.