



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**GUSTAVO FERNANDO MERCALDI**

GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE COMO ALVO MOLECULAR PARA  
DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS: ESTUDOS ESTRUTURAIS E  
IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES

**CAMPINAS**

**2016**

**GUSTAVO FERNANDO MERCALDI**

**GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE COMO ALVO MOLECULAR PARA  
DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS: ESTUDOS ESTRUTURAIS E  
IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES**

*Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas como parte dos requisitos  
exigidos para a obtenção do Título de  
Doutor em Ciências, na área de  
Fármacos, Medicamentos e Insumos  
para Saúde.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À  
REDAÇÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
PELO ALUNO GUSTAVO FERNANDO  
MERCALDI E ORIENTADA PELO DR. ARTUR  
TORRES CORDEIRO, APROVADA PELA  
COMISSÃO JULGADORA.

**Orientador: Dr. ARTUR TORRES CORDEIRO**

**CAMPINAS**

**2016**

**Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s):** FAPESP, 2010/17849-0; FAPESP, 2014/07533-7

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M533g Mercaldi, Gustavo Fernando, 1983-  
Glicose 6-fosfato desidrogenase como alvo molecular para desenvolvimento de fármacos : estudos estruturais e identificação de inibidores / Gustavo Fernando Mercaldi. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Artur Torres Cordeiro.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Tripanossomose. 2. Leishmaniose. 3. Glicose 6-fosfato desidrogenase. I. Cordeiro, Artur Torres. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Titulo em outro idioma:** Glucose 6-phosphate dehydrogenase as molecular target for drug development : structural studies and inhibitors identification

**Palavras-chave em inglês:**

Trypanosomiasis

Leishmaniasis

Glucose 6-phosphate dehydrogenase

**Área de concentração:** Fármacos, Medicamentos e Insumos para Saúde

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

Artur Torres Cordeiro [Orientador]

Alisson Campos Cardoso

Marcio Vinicius Bertacine Dias

Paulo Sérgio Lopes de Oliveira

Ariel Mariano Silber

**Data de defesa:** 13-07-2016

**Programa de Pós-Graduação:** Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos

Campinas, 13 de julho de 2016.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr. Artur Torres Cordeiro

Dr. Alisson Campos Cardoso

Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias

Dr. Paulo Sérgio Lopes de Oliveira

Dr. Ariel Mariano Silber

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Heraldo e Joceli, irmãos, Heitor e Guilherme, a minha esposa Miriam e ao meu filho Gustavo, por tornar os sabores mais intensos e os caminhos mais suaves.

## AGRADECIMENTOS

À família pelo incentivo, compreensão e apoio incondicional.

Ao Dr. Artur Torres Cordeiro pela orientação, confiança, amizade e incentivo; bem como aos integrantes do nosso grupo de pesquisa, Américo Ranzani, Jéssica Faria, Kaliandra Gonçalves, Michele Fagundes, Mario Barsottini, Marjorie Bruder, Sabrina Mota e Tereza Silva, pela amizade e ajuda na execução do projeto.

Ao Prof. Dr. Willian Hunter, pela oportunidade, ensinamentos e exemplo durante o período que estive na Escócia, bem como ao seu grupo de pesquisa, Carla Chiodi, Renata Reis, Dr. Laura Díaz-Sáez, Dr. Alice Dawson, Dr. Paul Fyfe.

Aos amigos de laboratório do LNBio, Alessandra, Aline Sampaio, Alisson, Ana Leticia, Angela Fala, Carla Polo, Cristiane Tambascia, Daniel, Douglas, Givanil Garrido, Igor Ferreira, Jéssica Lois, Jaqueline, Joice Paiva, Juliana Fattori, Juliana, Juliana Oliveira, Kelven, Maurício, Mariana Rangel, Mariane, Marilia, Talita, Silvana, Tabata, Vanderley, Vanessa e outros que eventualmente não tenham sido incluídos mas que são igualmente queridos, por toda a troca de experiências.

Aos amigos(as) feitos na Escócia, Thomas Eadsforth, Alisson Scott, Greg Stewart, Sharon Shepherd, Richard Owen, Yosua Kristariyanto, Tonia Aristotelous, Alain-Pierre Petit, Claire Shepherd, Lucia Guther e Elda Iljazi, pelo carinho e troca de conhecimentos.

Aos brasileiros estudantes da Universidade de Dundee, Adriana, Marcos, Tiago, Viviane, Juliana, Érika, Ronan, Guilherme, Claudia e Marilia, pela acolhida e amizade.

A todos os pesquisadores e funcionários do Laboratório Nacional de Biociências, bem como do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e University of Dundee (UoD), pela oportunidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão das bolsas de Doutorado e Estágio no Exterior, propiciando assim uma grande oportunidade de desenvolvimento científico e pessoal.

Por fim, o mais sincero obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste projeto e/ou para a minha formação acadêmica.

## RESUMO

Tripanossomíase americana e leishmanioses são doenças infecciosas potencialmente fatais, causadas pelos protozoários flagelados *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp, respectivamente. Essas enfermidades afetam milhões de pessoas, majoritariamente em países em desenvolvimento de regiões tropicais e subtropicais, causando um grande impacto nas populações afetadas. Os fármacos atualmente disponíveis para tratar essas condições possuem limitações quanto à segurança, eficácia e/ou regime de tratamento. Esse panorama ressalta a importância de iniciativas que contribuam para a compreensão da biologia destes parasitas ou para o desenvolvimento de novos fármacos com utilidade terapêutica. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) tem sido explorada como um alvo promissor para o desenvolvimento de fármacos. A G6PDH catalisa o primeiro passo da via de pentose fosfato, uma via essencial para manutenção do balanço oxidativo que também supre as células com moléculas importantes para biossíntese de lipídeos, nucleotídeos, vitaminas e aminoácidos. Esta enzima é essencial para sobrevivência de protozoários do gênero *Trypanosoma* de modo que depleção dos níveis da proteína, ou sua inibição por moléculas orgânicas, afeta o crescimento destes parasitas. Até o momento, os melhores inibidores da G6PDH são derivados halogenados do esteroide desidroepiandrosterona (DHEA), capazes de inibir fortemente as G6PDHs de humanos (*HsG6PDH*) e *T. cruzi* (*TcG6PDH*), mas sem efeito sobre a enzima de *L. mexicana* (*LmG6PDH*). Novos inibidores das G6PDHs foram identificados em uma coleção de 30.000 moléculas orgânicas através de uma campanha de triagem biológica automatizada em larga escala (HTS) com a *TcG6PDH*. Derivados de quinazolinonas e tienopirimidinas mostraram inibir a *TcG6PDH* por mecanismo incompetitivo e regras preliminares de relações estrutura-atividade foram estabelecidas para ambas as classes de inibidores. Características estruturais que contribuem para seletividade para a *TcG6PDH* sobre a enzima humana foram identificadas e experimentos com a forma epimastigota de *T. cruzi* mostraram que os derivados de quinazolinonas afetam a proliferação do parasito in vitro, indicando que as essas moléculas são promissoras inibidores que devem ser considerados para otimizações futuras. Derivados de quinazolinonas também se mostraram capazes de inibir a *LmG6PDH* por mecanismo incompetitivo, confirmando que a proteína de *Leishmania* possui um sítio para interação com inibidores após a formação do complexo enzima-substrato(s). Os derivados de quinazolinonas ativos contra a *LmG6PDH* surgem como potenciais sondas químicas para avaliar a importância destas enzimas em parasitas do gênero *Leishmania*. Finalmente, estudos estruturais com as G6PDHs permitiram a obtenção da estrutura

cristalográfica do complexo ternário *Tc*ΔG6PDH-G6P-NADPH, que revelou detalhes das bases moleculares de reconhecimento do substrato e do cofator. A comparação desta estrutura com a enzima homóloga humana permitiu a identificação de uma cavidade próxima ao sítio de ligação do cofator que pode ser explorada para o desenho de novos inibidores competitivos seletivos para a *Tc*G6PDH. Deste modo, nossos resultados contribuem para um aumento no conhecimento estrutural e funcional sobre as G6PDHs, uma enzima com papel biológico essencial, podendo em última instância auxiliar para um aumento da compreensão sobre a biologia de parasitas tripanossomatídeos, bem como para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas que venham atender necessidades clínicas não satisfeitas para doença de Chagas e leishmanioses.

## ABSTRACT

American trypanosomiasis and leishmaniasis are life-threatening infectious diseases, caused by flagellate protozoans *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp, respectively. Affecting millions of individuals, mainly in developing countries of tropical and subtropical areas, those conditions have a great impact in affected populations. Currently available drugs to treat those diseases suffer from limitations related to security, efficacy or treatment regimens. This scenario highlights the relevance of initiatives that contributes to the comprehension of the parasites biology or to the development of new clinically useful drugs. The enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) has been explored as a promising target for the development of new drugs. G6PDH catalysis the first and rate limiting step of the pentose phosphate pathway, which is essential for the maintenance of oxidative balance that also provides cells with important molecules for the biosynthesis of lipids, nucleotides, vitamins and amino acids. This enzyme is essential for the survival of protozoans from the genus *Trypanosoma*, in such a way that depletion of protein levels, or its specific inhibition by organic molecules, hampers parasites growth. Presently, the best G6PDH inhibitors are halogenated derivatives of the steroid dehydroepiandrosterone (DHEA), capable to strongly inhibit G6PDHs from humans (*HsG6PDH*) and *T. cruzi* (*TcG6PDH*), but with no effect on the *L. mexicana* enzyme (*LmG6PDH*). New G6PDH inhibitors have been identified in a 30.000 compounds library by a high throughput screening (HTS) campaign with the *TcG6PDH*. Quinazolinone and thienopyrimidine derivatives showed to inhibit the *TcG6PDH* through an uncompetitive mechanism and preliminary structure-activity relationship were established for both inhibitor classes. Structural features that contribute for selectivity towards *TcG6PDH* over the human enzyme were identified and experiments with *T. cruzi* epimastigote form showed that quinazolinone derivatives arrest parasite growth in vitro, suggesting that those molecules are promising inhibitors that should be considered for further optimization. Quinazolinone derivatives also showed to inhibit the *LmG6PDH* by uncompetitive mechanism, supporting the notion that proteins from *Leishmania* have an interaction site for inhibitors upon formation of an enzyme-substrate(s) complex. Quinazolinones derivatives with activity over the *LmG6PDH* emerge as potential chemical probes to evaluate the importance of this enzyme for parasites from the genus *Leishmania*. Finally, structural studies with G6PDHs allowed the obtention of the crystallographic structure from the ternary complex *Tc*ΔG6PDH-G6P-NADPH, which reveals details on the molecular basis of substrate and cofactor recognition. Comparison of this structure with the human homologous enzyme

revealed a cavity on the vicinity of the cofactor-binding site that might be explored towards the design of new competitive inhibitors selective for the *Tc*G6PDH. In this way, our results contribute to improve the structural and functional knowledge about the G6PDHs, an enzyme with an essential biological role, and may ultimately help to better understand the trypanosomatids parasite biology and to development of new therapeutic alternatives that satisfy unmet medical needs for Chagas disease and leishmaniasis.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

- Figura 1.1** Representação do processo de desenvolvimento de fármacos. Em destaque as etapas iniciais de pesquisa..... 29
- Figura 1.2** Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, causador do mal de Chagas..... 32
- Figura 1.3** Fármacos usados no tratamento da fase aguda da doença de Chagas. Tanto o benzonidazol quanto o nifurtimox são nitro-heterocíclicos com perfis de segurança e eficácia inadequados..... 33
- Figura 1.4** Ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp., agente causador das leishmanioses..... 34
- Figura 1.5** Fármacos usados no tratamento das Leishmanioses. Amfotericina B, paromomicina, miltefosina, pentamidina, allopurinol e estibogluconato de sódio (Pentostam). Pentostam é um exemplo dos antimoniais pentavalentes, que pode incluir ainda antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime)..... 36
- Figura 1.6** Representação esquemática da via de pentose fosfatos. NADPH (vermelho) gerado no ramo oxidativo é usado na proteção contra stress oxidativo e biossíntese de lipídeos. Ribose-5-fosfato participa da biogênese de nucleotídeos e eritrose-4-fosfato é precursor de coenzimas e amino ácidos aromáticos. Glicose-6-fosfato, Frutose-6-fosfato e Gliceraldeído-3-fosfato, em verde, são compartilhadas com a via glicolítica..... 39
- Figura 1.7** Esquema da reação catalisada pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Os produtos 6-fosfoglicono- $\delta$ -lactona e NADPH são formados a partir de  $\beta$ -D-glicose-6-fosfato (G6P) e NADP<sup>+</sup>. Os carbonos 1 e 6 do G6P, bem como o carbono 4 do grupo nicotinamida do NADP(H), estão numerados..... 40
- Figura 1.8** Estrutura dos esteroides que atuam como inibidores incompetitivos da G6PDH..... 42

### CAPÍTULO 2

- Figura 2.1** Mapa do vetor pET-SUMO, modificado a partir do vetor pET28. A sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína SUMO foi inserida entre os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *NheI* e *BamHI*..... 47
- Figura 2.2** Esquema da reação *TcG6PDH* acoplada ao sistema diaforase-resazurina usado nos ensaios de HTS..... 48

- Figura 2.3** Mapa do vetor *pET28-TEV*, modificado a partir do vetor *pET28a* para codificar o sítio de reconhecimento da protease TEV. Os sítios de clonagem estão coloridos de acordo com as enzimas de restrição mostradas acima deles..... 59
- Figura 2.4** Géis de agarose (1%) obtidos na construção do sistema de expressão da *LmΔG6PDH* e *TcΔG6PDH* em *pET28-TEV*. **A)** Colunas 1 e 2, *pET28-TEV* (~ 5.400 bp); Colunas 3 e 4, *pET28a\_LmΔG6PDH*; Colunas 5 e 6, *pET28a\_TcΔG6PDH*. **B)** DNA plasmidial extraído de dois clones obtidos após reação de ligação da *LmΔG6PDH* (colunas 1 e 2) e *TcΔG6PDH* (colunas 3 e 4) com *pET28-TEV*. Um dos clones (coluna 3) não apresentava o inserto. HyperLadder 1kb (Bioline) usado como marcador molecular (**M**). Conforme descrito na metodologia, todas as amostras foram digeridas com *BamHI* e *XhoI*.... 60
- Figura 2.5** Géis de agarose (1%) obtidos na construção do sistema de expressão *pET28-TEV\_TcG6PDH*. **A)** Colunas 1 e 2, *pET28a\_TcΔG6PDH*; Coluna 3, *pET28-TEV*. **B)** DNA plasmidial extraído de dois clones obtidos após reação de ligação da *TcG6PDH* com *pET28-TEV* (colunas 1 e 2). HyperLadder 1kb (Bioline) usado como marcador molecular (**M**). Conforme descrito na metodologia, todas as amostras foram digeridas com *NheI-HF* e *XhoI*..... 62

### CAPÍTULO 3

- Figura 3.1** Purificação da *TcG6PDH*. **A)** Cromatograma obtido na cromatografia de exclusão molecular. Frações indicadas por números foram analisadas por SDS-PAGE. **B)** Análise por SDS-PAGE das amostras obtidas durante purificação da *TcG6PDH*. Amostras na coluna AF foi obtida na cromatografia de afinidade, sendo que as amostras nas colunas 1 a 5 foram obtidas na cromatografia de exclusão molecular. Coluna M, marcador de massa molecular. Gel de poliacrilamida 12% revelado pelo método de Coomassie..... 70
- Figura 3.2** Purificação da *HsΔG6PDH* usada na caracterização dos novos inibidores da G6PDH. **A)** Cromatograma mostrando o perfil de eluição das proteínas durante a cromatografia de exclusão molecular. Frações indicadas por números foram analisadas por SDS-PAGE. **B)** Análise por SDS-PAGE das amostras obtidas durante purificação da *HsΔG6PDH*. Amostra na coluna AF foi obtida na cromatografia de afinidade, sendo que as amostras nas colunas 1 a 9 foram obtidas na cromatografia de exclusão molecular. Coluna M, marcador de massa molecular. Gel de poliacrilamida 12% revelado pelo método de Coomassie..... 71

- Figura 3.3** Gráficos de Michaelis-Menten para G6P e NADP<sup>+</sup> obtidos com a enzima *TcG6PDH*. Os valores de  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$  obtidos na presença de triton X-100 estão de acordo com os dados publicados para a enzima..... 72
- Figura 3.4** Ensaio com a *TcG6PDH* usando o sistema acoplado diaforase-resorufina. **A)** Experimentos com diferentes concentrações de DMSO mostrando que concentrações de até 8-10% do solvente são bem toleradas. **B)** Curvas concentração-resposta obtidas em ensaios de inibição com os derivados de esteroides. Os valores de  $IC_{50}$  estimados para o DHEA, EA e 16BrEA são de 26,7  $\mu$ M (23,7 a 30,0  $\mu$ M), 9,8  $\mu$ M (8,7 a 11,0  $\mu$ M) e 0,31  $\mu$ M (0,28 a 0,35  $\mu$ M), respectivamente. Os valores em parênteses correspondem aos limites estimados usando um intervalo de confiança de 95%..... 73
- Figura 3.5** Fator  $Z'$  calculado para todas as placas da campanha de HTS da *TcG6PDH* usando a biblioteca DIVERSet (ChemBridge)..... 74
- Figura 3.6** Resultado da campanha de HTS da *TcG6PDH*. A porcentagem de atividade remanescente da enzima contra cada molécula da biblioteca DiverSet (Chembridge) foi calculada usando os controles positivos e negativos de cada placa. Todas as moléculas foram testadas a uma concentração de 20  $\mu$ M. Noventa e seis moléculas reduziram a atividade da *TcG6PDH* para menos de 62,5%, sendo consideradas candidatas a hit..... 74
- Figura 3.7** Moléculas consideradas hits e resultados dos ensaios ortogonais. As 10 moléculas representadas foram selecionadas para os estudos subsequentes por apresentarem um efeito dependente da concentração. Conforme será mostrada a seguir, as moléculas 5160354, 6130303, 6985461 e 7708424 acabaram sendo caracterizadas como falsos positivos..... 76
- Figura 3.8** Efeito dos derivados de tienopirimidinas e esteroides (A), quinazolinonas (B) e quinazolinonas-piperazina (C) sobre as G6PDH de *T. cruzi* e humanos. DHEA, EA e 16BrEA (estruturas na figura 18, pág. 40) foram incluídas para ilustrar a falta de seletividade dos esteroides, reduzindo a atividade de ambas as enzimas. As estruturas das outras moléculas estão apresentadas nas tabelas 3.2, 3.3 e 3.4..... 78

- Figura 3.9** Agrupamento dos inibidores da *TcG6PDH* por similaridade estrutural. Além do grupo formado por esteroides previamente descritos (DHEA, EA, e 16BrEA), três novos grupo são observados, um contendo 20 quinazolinonas e outros dois menores com 6 derivados de quinazolinonas-piperazinas e 5 derivados de tienopirimidinas. Cada molécula é representada por uma esfera, colorida de vermelho (mais potente) a verde (menos potentes). Os valores de  $IC_{50}$  estão reportados na tabela 3.2 (tienopirimidinas), 3.3 (quinazolinonas), 3.4 (quinazolinonas-piperazinas) e 3.5 (esteroides). A relação entre a estrutura e atividade destes inibidores será discutida no item 3.8. O agrupamento foi feito usando um índice de similaridade de 0,7, baseado no coeficiente de Tanimoto..... 79
- Figura 3.10** Curvas concentração-resposta do esteroide 16BrEA (A), da tienopirimidina 7963739 (B) e da quinazolinona 9068502 (C) para a *TcG6PDH* (●) e *HsΔG6PDH* (□). Os novos inibidores identificados por *HTS* apresentam uma seletividade que não foi observada para os esteroides descritos como inibidores da G6PDH..... 85
- Figura 3.11** Gráficos duplo-recíproco de ambos os substratos da *TcG6PDH* obtidos titulando os inibidores identificados por *HTS*. Curvas paralelas características de inibidores incompetivos, que reduzem tanto os valores aparentes de  $K_m$  quanto de  $V_{max}$  com aumento da concentração do inibidor, foram obtidas na titulação da tienopirimidina 7955679 (A), quinazolinona 9126312 (B) e quinazolinona-piperazina 9068502 (C). Os pontos de interceptação no eixo das abcissas (X) e ordenadas (Y) correspondem aos valores de  $-1/K_m$  e  $1/V_{max}$ , respectivamente. Os valores de  $\alpha K_i$  estão reportados na tabela 3.6..... 86
- Figura 3.12** Ilustração das principais relações entre estrutura e atividade observadas para os derivados de tienopirimidinas..... 87
- Figura 3.13** Ilustração da importância do grupo carboxamida para atividade das tienopirimidinas contra a *TcG6PDH*. Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança de 95%. **AR80** é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu$ M da molécula testada..... 87
- Figura 3.14** Ilustração das principais relações entre estrutura e atividade observadas para os derivados de quinazolinonas..... 88
- Figura 3.15** Ilustração mostrando a relação estrutura-atividade da posição C7 (R3) das quinazolinonas contra a *TcG6PDH*. Um aumento no volume do substituinte R3 causa uma diminuição na atividade. Em parênteses estão os intervalos de confiança de 95%. **AR80** é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu$ M da molécula testada..... 89

- Figura 3.16** Atividade de derivados de quinazolinonas-piperazinas contra a *TcG6PDH*. Em parênteses estão os intervalos de confiança de 95%. *AR80* é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu$ M da molécula testada..... 91
- Figura 3.17** Atividade de derivados de quinazolinonas-piperazinas contra a *TcG6PDH*. *AR80* é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu$ M da molécula testada. Valores reportados referem-se às médias e desvios padrões..... 92

#### CAPÍTULO 4

- Figura 4.1** Cromatografia de afinidade da *LmG6PDH*. **A)** Cromatograma mostrando porcentagem do tampão B3 usado para gerar gradiente de imidazol (20, 40, 80, 200, 400 e 1.000 mM). Setas no cromatograma indicam as frações usadas no SDS-PAGE, numeradas de acordo com as colunas do gel. **B)** Gel de poliacrilamida 12% mostrando que a *LmG6PDH* eluí com 80 e 200 mM imidazol (colunas 7-9), apresentando contaminantes de baixo peso molecular. Proteínas reveladas com Azul de Coomassie. Coluna M, marcador de massa molecular..... 94
- Figura 4.2** Cromatografia de exclusão molecular da *LmG6PDH*. **A)** Cromatograma de eluição isocrática mostrando o perfil de eluição das proteínas. Frações indicadas por números foram analisadas por SDS-PAGE. **B)** SDS-PAGE das amostras obtidas durante cromatografia mostrando que a *LmG6PDH* (coluna 2) foi separada de outras proteínas de baixo peso molecular (colunas 3 e 4). Gel de poliacrilamida 12% revelado com Azul de Coomassie. Coluna M, marcador de massa molecular..... 95
- Figura 4.3** Gráficos de Michaelis-Menten do G6P e  $\text{NADP}^+$  para a *LmG6PDH*. Os valores de  $K_m$  e  $V_{\text{max}}$  aparentes estão reportados acima das curvas de Michaelis-Menten..... 95
- Figura 4.4** Gráficos duplo-recíproco de ambos os substratos da *LmG6PDH* obtidos titulando o inibidor 9148049. Curvas paralelas obtidas são características de inibidores incompetitivos, que reduzem tanto os valores aparentes de  $K_m$  quanto de  $V_{\text{max}}$  com aumento da concentração do inibidor. Os pontos de interceptação no eixo das abcissas (X) e ordenadas (Y) correspondem aos valores de  $-1/K_m$  e  $1/V_{\text{max}}$ , respectivamente. Os valores de  $\alpha K_i$  obtidos contra o G6P e  $\text{NADP}^+$  foram  $1,89 \pm 0,05 \mu\text{M}$  e  $1,70 \pm 0,06 \mu\text{M}$ , respectivamente..... 98

## CAPÍTULO 5

- Figura 5.1** Valores de  $EC_{50}$  do EA, 16BrEA e Benzonidazol para a forma epimastigota de *T. cruzi* cepa Y. Os valores de  $EC_{50}$  obtidos estão de acordo com os dados de literatura..... 100
- Figura 5.2** Atividade tripanocida dos inibidores da glicose-6-fosfato desidrogenase. Estão representados os derivados ativos ou moderadamente ativos pertencentes aos grupos das tienopirimidinas (barra cinza), quinazolinonas (barras brancas) e quinazolinona-piperazina (barra tracejada). O benzonidazol (barra preta), adicionado como controle, não atua sobre a G6PDH. Todas as moléculas foram testadas a uma concentração de 80  $\mu$ M com a forma epimastigota de *T. cruzi* cepa Y..... 101
- Figura 5.3** Ensaios concentração-resposta dos derivados de quinazolinona contra *T. cruzi* cepa Y. Os ensaios foram feitos com a forma epimastigota do parasito. Os valores de  $EC_{50}$  foram obtidos por regressão não-linear usando o software GraphPad Prism. Em parênteses representam intervalos de confiança de 99%..... 102

## CAPÍTULO 6

- Figura 6.1** Alinhamento das sequências de G6PDHs de *T. cruzi* (*Tc*), *Humanos* (*Hs*), *M. avium* (*Ma*) e *L. mesenteroides* (*Lmes*). Met1 (amarelo) e Met38 (azul) são os primeiros aminoácidos da *Tc*G6PDH longa e curta, respectivamente. Asp58 (laranja) e Thr545 (vermelho) são o primeiro e último resíduo da *Tc* $\Delta$ G6PDH, respectivamente. Ser60 (magenta) e Gln551 (verde) marcam o início e fim da *Lm* $\Delta$ G6PDH, respectivamente. Resíduos que reconhecem o G6P (retângulos vermelhos), NADP(H) catalítico (retângulos azuis) ou NADP<sup>+</sup> estrutural (retângulos pretos) estão destacados. As setas ( $\downarrow$ ) indicam resíduos que formam uma cavidade abaixo do sítio do NADP(H) catalítico..... 106
- Figura 6.2** Cromatografia de afinidade da *Tc* $\Delta$ G6PDH. **A)** Cromatograma obtido por medida da absorbância a 280 nm, mostrando gradiente do tampão B. Setas no cromatograma indicam as frações usadas no SDS-PAGE, numeradas de acordo com as colunas do gel. **B)** Gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) obtido em condição desnaturante (SDS-PAGE) mostra que a *Tc* $\Delta$ G6PDH (coluna 5) elui com elevado grau de pureza quando concentração de imidazol está próxima de 200 mM imidazol. Detecção das proteínas feita por fluorescência usando sistema de detecção livre de corante Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa..... 107

<b>Figura 6.3</b>	Cromatografia de exclusão molecular da <i>Tc</i> ΔG6PDH e análise da estrutura quaternária. <b>A)</b> Cromatograma de eluição isocrática mostra que uma amostra homogênea da proteína elui com uma estrutura quaternária correspondente a um tetrâmero (gráfico do canto superior direito). <b>B)</b> SDS-PAGE da amostra da <i>Tc</i> ΔG6PDH (coluna 1) obtida na cromatografia. Gel (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) revelado com sistema de detecção Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa.....	108
<b>Figura 6.4</b>	SDS-PAGE da amostra de <i>Tc</i> G6PDH (coluna 1) obtida na cromatografia de afinidade. Gel (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) revelado com sistema de detecção Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa.....	109
<b>Figura 6.5</b>	Cromatografia de afinidade da <i>Lm</i> ΔG6PDH. <b>A)</b> Cromatograma mostrando a absorbância no UV e a porcentagem do tampão B2, usado para gerar um gradiente de imidazol. Setas no cromatograma indicam as frações usadas no SDS-PAGE, numeradas de acordo com as colunas do gel. <b>B)</b> Gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) mostrando que a <i>Lm</i> ΔG6PDH (coluna 5) eluída com 200 mM imidazol apresenta alto grau de pureza. Proteínas reveladas com sistema Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massa molecular.....	109
<b>Figura 6.6</b>	Cromatografia de exclusão molecular da <i>Lm</i> ΔG6PDH e análise da estrutura quaternária. <b>A)</b> Cromatograma de eluição isocrática mostra que uma amostra homogênea da proteína elui com uma estrutura quaternária correspondente a um dímero (gráfico do canto superior direito). <b>B)</b> SDS-PAGE da amostra da <i>Lm</i> ΔG6PDH (coluna 1) obtida na cromatografia. Gel Mini-PROTEAN TGX Stain Free (BIORAD) revelado com sistema de detecção Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa.....	110
<b>Figura 6.7</b>	Gráficos de Michaelis-Menten para G6P e NADP <sup>+</sup> . <b>A)</b> $K_m^{app}$ e $V_{max}^{app}$ obtidos para <i>Tc</i> ΔG6PDH. <b>B)</b> $K_m^{app}$ e $V_{max}^{app}$ observados para a <i>Tc</i> G6PDH-TEV.....	111
<b>Figura 6.8</b>	Gráficos de Michaelis-Menten do G6P e NADP <sup>+</sup> para a <i>Lm</i> ΔG6PDH. Os valores de $K_m$ e $V_{max}$ aparentes estão representados na figura.....	112
<b>Figura 6.9</b>	Cristais obtidos na triagem inicial da <i>Tc</i> ΔG6PDH. Fotos do poço G1 do kit JCSG plus, contendo 30 % jefamina ED-2003 e 0,1 M HEPES pH 7,0.....	112

- Figura 6.10** Cristalização da *Tc*ΔG6PDH e padrão de difração de raios-X. **A)** Típico cristal da enzima truncada, obtido misturando 2 μL da solução de proteína (10 mg.ml<sup>-1</sup> *Tc*ΔG6PDH, 5 mM de G6P, 2 mM NADPH, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 M NaCl, 5 mM β-ME) com 1 μL da precipitante (27-32 % de jeffamina ED-2003, 0,1 M HEPES pH 6,8-7,2). **B)** Padrão de difração da *Tc*ΔG6PDH obtido na linha I04 do Diamond usando detector do tipo Pilatus 2M..... 113
- Figura 6.11** Representação na forma de fitas e esferas da *Tc*ΔG6PDH e seus ligantes. **A)** Estrutura de uma subunidade, mostrando o domínio Rossmann N-terminal (laranja), domínio β + α C-terminal (cinza), NADPH (esferas magenta) e o G6P (esferas verdes). O sítio do NADP<sup>+</sup> estrutural na *Hs*G6PDH está indicado (elipse vermelha). **B)** Unidade biológica da *Tc*ΔG6PDH: resíduos da interface do tetrâmero são exclusivamente localizados no domínio β + α. Dois tetrâmeros únicos podem ser gerados a partir das subunidades da *Tc*ΔG6PDH, um com a cadeia A e vizinhos relacionados por simetria (A', A'' e A''') e outro usando o dímero formado pelas cadeias B e C e um dímero relacionado por simetria (B' e C')..... 115
- Figura 6.12** Esquema da reação catalisada pela G6PDH. Na *Tc*G6PDH, o átomo N<sup>δ1</sup> da His309 faz uma ligação de hidrogênio com o O<sup>δ1</sup> do Asp246, formando o par catalítico da enzima. O átomo N<sup>ε2</sup> da His309 atua como base que abstrai o próton da hidroxila do C1 do G6P, induzindo a transferência do hidreto do C1 para o C4 do motivo nicotinamida do NADP<sup>+</sup>. Como produto da reação, são formados 6-fosfoglicono-δ-lactona e NADPH. Apenas o grupo nicotinamida do NADP(H) está representado na ilustração..... 116
- Figura 6.13** Sítio de ligação do G6P na enzima G6PDH de *Trypanosoma cruzi*. **A)** Orientação do substrato na estrutura do complexo ternário (PDB 5AQ1) obtido pelo nosso grupo. Mapa *Fo-Fc* do G6P contornado a 3,8 σ. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio. **B)** Orientação do substrato na estrutura do complexo binário (PDB 4EM5), com a piranose em uma conformação não compatível com o mecanismo de reação. A His309 e Asp246 (bastões amarelos) formam o par catalítico responsável pela abstração do próton da hidroxila do C1 do G6P. Os resíduos em cinza e amarelo pertencem ao domínio β + α, enquanto a Lys217 (bastão laranja) pertence do domínio Rossmann. As figuras foram preparadas usando a cadeia A de ambas as estruturas. 118

- Figura 6.14** Comparação entre o sítio de ligação do NADP(H) catalítico da *Tc*ΔG6PDH (cadeia A; PDB 5AQ1) e *Hs*G6PDH (cadeia A; PDB 2BH9). **A)** Resíduos da *Tc*ΔG6PDH (laranja claro) fazendo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) com o NADPH catalítico (magenta). Mapa *Fo-Fc* do NADPH representado com  $\sigma$  igual a 2,5. **B)** Resíduos da *Hs*G6PDH (azul claro) fazendo interações de hidrogênio (linhas tracejadas) com o NADP<sup>+</sup> catalítico (amarelo)..... 119
- Figura 6.15** Representação na forma de bastões do NADPH (magenta), G6P (verde) e do par catalítico (amarelo) da estrutura da *Tc*ΔG6PDH. As distâncias entre os átomos envolvidos na reação de catalise estão mostradas em angstroms (Å). Figura preparada usando a cadeia A da enzima (PDB 5AQ1)..... 120
- Figura 6.16** Vizinhança do sítio do NADP(H) catalítico na G6PDH humana e de *T. cruzi*. A comparação entre a *Tc*ΔG6PDH (A) e *Hs*G6PDH (B) mostra a entrada da cavidade acessória na enzima do parasito, próximo a ribose da nicotinamida, que não é observada na enzima humana..... 121
- Figura 6.17** Diagrama estérico da mostrando uma secção da cavidade encontrada no domínio Rossmann da *Tc*ΔG6PDH. Os resíduos que definem a cavidade são majoritariamente hidrofóbicos (Tabela 6.4). As esferas verdes foram adicionadas pelo software KVFinder e usadas para estimar o volume da cavidade (aproximadamente 220 Å<sup>3</sup>)..... 122
- Figura 6.18** Sítio do NADP<sup>+</sup> estrutural. **(A)** Na *Hs*G6PDH (PDB 2BH9) o NADP<sup>+</sup> estrutural (bastões amarelos) ancora no domínio  $\beta + \alpha$  através ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) ou empilhamento de elétrons- $\pi$ . **(B)** A comparação com *Tc*ΔG6PDH mostra que a Lys366, Arg487 e Tyr503 da *Hs*G6PDH são equivalentes a Leu409, Cys528 e Thr544 na *Tc*ΔG6PDH (destacados em vermelho), respectivamente. Essas mudanças podem comprometer a ligação do NADP<sup>+</sup> estrutural. A figura foi preparada usando a cadeia A das estruturas da enzima humana e *T. cruzi*..... 125

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1.1** Formas de doença causadas pelas principais espécies de *Leishmania*. Os parasitas pertencentes ao subgênero *L. (Leishmania)* se desenvolvem no intestino médio e anterior dos flebotomíneos, enquanto os do subgênero *L. (Viannia)* se desenvolvem no intestino posterior do inseto..... 35
- Tabela 1.2** Fármacos usados no tratamento das leishmanioses..... 37

### CAPÍTULO 2

- Tabela 2.1** Composição do meio LIT pH 7,2 usado para cultivar células epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*..... 57
- Tabela 2.2** Protocolo usado na digestão dupla do vetor *pET28-TEV* e das construções *pET28a\_TcΔG6PDH* e *pET28a\_LmΔG6PDH*..... 60
- Tabela 2.3** Protocolo usado nas reações de ligação dos genes *TcΔG6PDH* e *LmΔG6PDH* aos vetores *pET28-TEV*..... 61
- Tabela 2.4** Protocolo usado na digestão dupla da construção *pET28-TEV\_TcΔG6PDH*..... 61
- Tabela 2.5** Protocolo usado na digestão dupla do vetor *pET28-TEV* e da construção *pET28a\_TcG6PDH*..... 62
- Tabela 2.6** Protocolo usado na reação de ligação do gene *TcG6PDH* ao vetor *pET28-TEV*, ambos digeridos com as enzimas de restrição *NheI*-HF e *XhoI*..... 63
- Tabela 2.7** Protocolo usado para digestão dupla das construções *pET28-TEV\_TcΔG6PDH* e *pET28-TEV\_LmΔG6PDH*..... 63
- Tabela 2.8** Triagens Iniciais de Condições de Cristalização das G6PDHs Truncadas..... 66

### CAPÍTULO 3

- Tabela 3.1** Moléculas excluídas da lista de hits da *TcG6PDH* por apresentarem atividade contra a enzima diaforase..... 77
- Tabela 3.2** Atividade das tienopirimidinas sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (*TcG6PDH*) e humana (*HsΔG6PDH*)..... 80
- Tabela 3.3** Atividade das quinazolinonas sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (*TcG6PDH*) e humana (*HsΔG6PDH*)..... 81

<b>Tabela 3.4</b>	Atividade das quinazolinonas-piperazina sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> ( <i>TcG6PDH</i> ) e humana ( <i>HsΔG6PDH</i> ).....	83
<b>Tabela 3.5</b>	Atividade dos esteroides sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> ( <i>TcG6PDH</i> ) e humana ( <i>HsΔG6PDH</i> ).....	84
<b>Tabela 3.6</b>	Valores de $\alpha K_i$ dos inibidores incompetivos da <i>TcG6PDH</i> obtidos contra o substrato G6P e cofator NADP <sup>+</sup> .....	86

#### CAPÍTULO 4

<b>Tabela 4.1</b>	Atividade das quinazolinonas sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de <i>L. mexicana</i> ( <i>LmG6PDH</i> ) e humana ( <i>HsΔG6PDH</i> ).....	97
-------------------	---	----

#### CAPÍTULO 6

<b>Tabela 6.1</b>	Estatísticas cristalográficas do complexo ternário da <i>TcΔG6PDH</i> -G6P-NADPH. Modelo final depositado no PDB sob o código 5AQ1.....	114
<b>Tabela 6.2</b>	Ligações de hidrogênio formadas pelo G6P na <i>TcΔG6PDH</i> (PDB 5AQ1). As distâncias reportadas referem-se à cadeia A.....	117
<b>Tabela 6.3</b>	Ligações de hidrogênio formadas pelo NADPH na <i>TcΔG6PDH</i> (PDB 5AQ1). Distâncias reportadas são referentes à cadeia A.....	119
<b>Tabela 6.4</b>	Resíduos e átomos formando a parede da cavidade vizinha ao sítio do NADP(H) catalítico na <i>TcΔG6PDH</i> . Os valores em parênteses correspondem à área (Å <sup>2</sup> ) da superfície acessível ao solvente (SAS) do átomo, calculada com o programa AREAIMOL disponível no pacote CCP4.....	122
<b>Tabela 6.5</b>	Estruturas de enzimas humanas que de acordo com a base de dados CATH possuem um domínio do tipo Rossmann capaz de ligar NADP(H). Estruturas representativas possuindo uma identidade de sequência de 70% foram recuperadas do PDB.....	123

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

$\beta$ -ME -  $\beta$ -Mercaptoetanol

$\lambda$  – Comprimento de onda

$^{\circ}\text{C}$  – Grau Celsius

16BrEA – 16- $\alpha$ -Bromo-epiandrosterona

ADME - Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

DHEA – Desidroepiandrosterona

DMSO – Dimetil sulfóxido

EA - Epiandrosterona

DNA – Ácido desoxirribonucleico

$EC_{50}$  – Concentração de uma molécula orgânica que produz metade do efeito máximo

G6P – Glicose 6-Fosfato

G6PDH – Glicose 6-fosfato Desidrogenase

HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfônico

*Hit* – Pequena molécula orgânica com atividade biológica

*HsG6PDH* – G6PDH de *Homo sapiens*

*Hs $\Delta$ G6PDH* – G6PDH de *Homo sapiens* truncada

HTS – Triagem biológica automatizada em larga escala (do inglês, *high throughput screening*)

$IC_{50}$  – Concentração do inibidor que reduz a velocidade de reação pela metade

$k_{\text{cat}}$  – Constante catalítica

kDa – kilo daltons

$k_i$  – Constante de inibição ou de dissociação do complexo enzima-inibidor

$K_m$  – Constante de Michaelis-Menten

LB – *Lysogeny broth*

*LmesG6PDH* – G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides*

*LmG6PDH* – G6PDH de *Leishmania mexicana*

*Lm $\Delta$ G6PDH* – G6PDH de *Leishmania mexicana* Truncada

NADP<sup>+</sup> - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma oxidada

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato, forma reduzida

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDB – Banco de Dados de Proteínas

REA – Relação estrutura-atividade

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

TEV – Vírus do mosaico do tomate

*TcG6PDH* – G6PDH de *Trypanosoma cruzi*

*TcΔG6PDH* – G6PDH de *Trypanosoma cruzi* Truncada

Tris – Tris(hidroximetil)aminometano

$V_{\max}$  – Velocidade máxima de reação

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>27</b>
1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS .....	28
1.1 – Estágios Iniciais do Desenvolvimento de Fármacos .....	28
1.2 – Doenças Negligenciadas.....	30
1.2.1 – Doença de Chagas .....	30
1.2.2 - Leishmanioses .....	33
1.3 – Metabolismo Energético de Tripanosomatídeos e a Via de Pentoses.....	37
1.3.1 - Enzima Glicose-6-fosfato Desidrogenase .....	40
1.4 – Construção da Hipótese e Objetivos.....	43
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>45</b>
2 – METODOLOGIA.....	46
2.1 – Identificação e Caracterização de Inibidores da G6PDH de <i>T. cruzi</i> .....	46
2.1.1 – Produção e Purificação da G6PDH de <i>T. cruzi</i> e Humana usadas na Identificação e Caracterização de Novos Inibidores .....	46
2.1.2 – Avaliação da Atividade da <i>TcG6PDH</i> .....	47
2.1.3 - Ensaio Primário Usado na Triagem Biológica Automatizada em Larga Escala ...	49
2.1.4 – Confirmação dos Hits por Ensaio Ortogonal.....	50
2.1.5 – Caracterização dos Hits e Derivados .....	51
2.1.6 – Determinação dos Valores de $IC_{50}$ .....	52
2.1.7 – Mecanismo de Inibição.....	53
2.1.8 – Agrupamentos dos Inibidores por Índice de Similaridade Estrutural.....	54
2.2 – Inibição da G6PDH de <i>L. mexicana</i> por Quinazolinonas.....	54
2.2.1 – Produção e Purificação da <i>LmG6PDH</i> .....	54
2.2.2 – Ensaio Cinéticos com a <i>LmG6PDH</i> .....	55
2.2.3 - Determinação dos Valores de $IC_{50}$ .....	55
2.2.4 – Mecanismo de Inibição das Quinazolinonas .....	56
2.3 – Avaliação do Efeito das Quinazolinonas e Tienopirimidinas sobre a Viabilidade do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	56
2.3.1 – Cultivo da Forma Epimastigota de <i>T. cruzi</i> cepa Y .....	56
2.3.2 –Ensaio de Viabilidade Celular com a Forma Epimastigota de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) .	57
2.4 – Estudos Estruturais e Cinéticos da G6PDH Truncada.....	58
2.4.1 – Desenho das Construções Truncadas.....	58
2.4.2 – Clonagem das G6PDHs Truncadas em Vetor de Expressão pET28-TEV .....	58
2.4.3 – Clonagem da <i>TcG6PDH</i> em vetor de expressão pET28-TEV .....	61
2.4.4 – Produção e Purificação da <i>TcΔG6PDH</i> e <i>TcG6PDH-TEV</i> .....	63

2.4.5 – Produção e Purificação da <i>Lm</i> ΔG6PDH.....	64
2.3.6 – Ensaios Cinéticos com a <i>Tc</i> ΔG6PDH e <i>Tc</i> G6PDH-TEV.....	64
2.4.7 – Ensaios Cinéticos com a <i>Lm</i> ΔG6PDH .....	65
2.4.8 – Ensaios de Cristalização da <i>Tc</i> ΔG6PDH e <i>Lm</i> ΔG6PDH.....	65
2.4.9 – Coleta dos Dados, Processamento e Determinação da Estrutura da <i>Tc</i> ΔG6PDH.....	67
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>69</b>
3 – IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA G6PDH DE <i>T. cruzi</i> .....	70
3.1 – Produção e Purificação da G6PDH de <i>T. cruzi</i> e humana usadas na Identificação e Caracterização de Novos Inibidores.....	70
3.2 – Avaliação da Atividade da <i>Tc</i> G6PDH.....	71
3.3 – Ensaio Primário de Triagem Biológica Automatizada em Larga Escala.....	73
3.4 – Confirmação dos Hits por Ensaio Ortogonal.....	75
3.5 – Caracterização dos Hits e Derivados.....	75
3.6 – Mecanismo de Inibição.....	85
3.7 – Relação entre Estrutura e Atividade dos Novos Inibidores da <i>Tc</i> G6PDH.....	87
3.7.1 – Derivados de Tienopirimidinas.....	87
3.7.2 – Derivados de Quinazolinonas.....	88
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>93</b>
4 – INIBIÇÃO DA G6PDH DE <i>L. mexicana</i> POR QUINAZOLINONAS .....	94
4.1 – Produção e Purificação da <i>Lm</i> G6PDH .....	94
4.2 – Atividade Catalítica da <i>Lm</i> G6PDH .....	95
4.3 – Inibição da <i>Lm</i> G6PDH por derivados de Quinazolinona.....	96
4.4 – Mecanismo de Inibição.....	97
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>99</b>
5 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS QUINAZOLINONAS E TIENOPIRIMIDINAS SOBRE <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	100
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>104</b>
6 – ESTUDOS ESTRUTURAIS E CINÉTICOS DAS G6PDHS TRUNCADAS .....	105
6.1 - Construções truncadas das G6PDHs de <i>T. cruzi</i> e <i>L. mexicana</i> .....	105
6.2 – Produção e Purificação da <i>Tc</i> ΔG6PDH e <i>Tc</i> G6PDH-TEV.....	107
6.3 – Produção e Purificação da <i>Lm</i> ΔG6PDH.....	109
6.4 – Atividade Catalítica <i>Tc</i> ΔG6PDH e <i>Tc</i> G6PDH-TEV .....	110
6.5 – Atividade Catalítica da <i>Lm</i> ΔG6PDH e <i>Lm</i> G6PDH .....	111
6.6 – Ensaios de Cristalização das G6PDHs Truncadas.....	112
6.7 – Estrutura da G6PDH de <i>T. cruzi</i> .....	113
6.8 – Sítio de Ligação do G6P .....	116
6.9 – Sítio de Ligação do NADP(H) Catalítico.....	118
6.10 – Sítio do NADP <sup>+</sup> Estrutural .....	125

<b>CAPÍTULO 7</b> .....	<b>127</b>
7 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	128
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>131</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>142</b>

# Capítulo 1

## *Introdução e Objetivos*

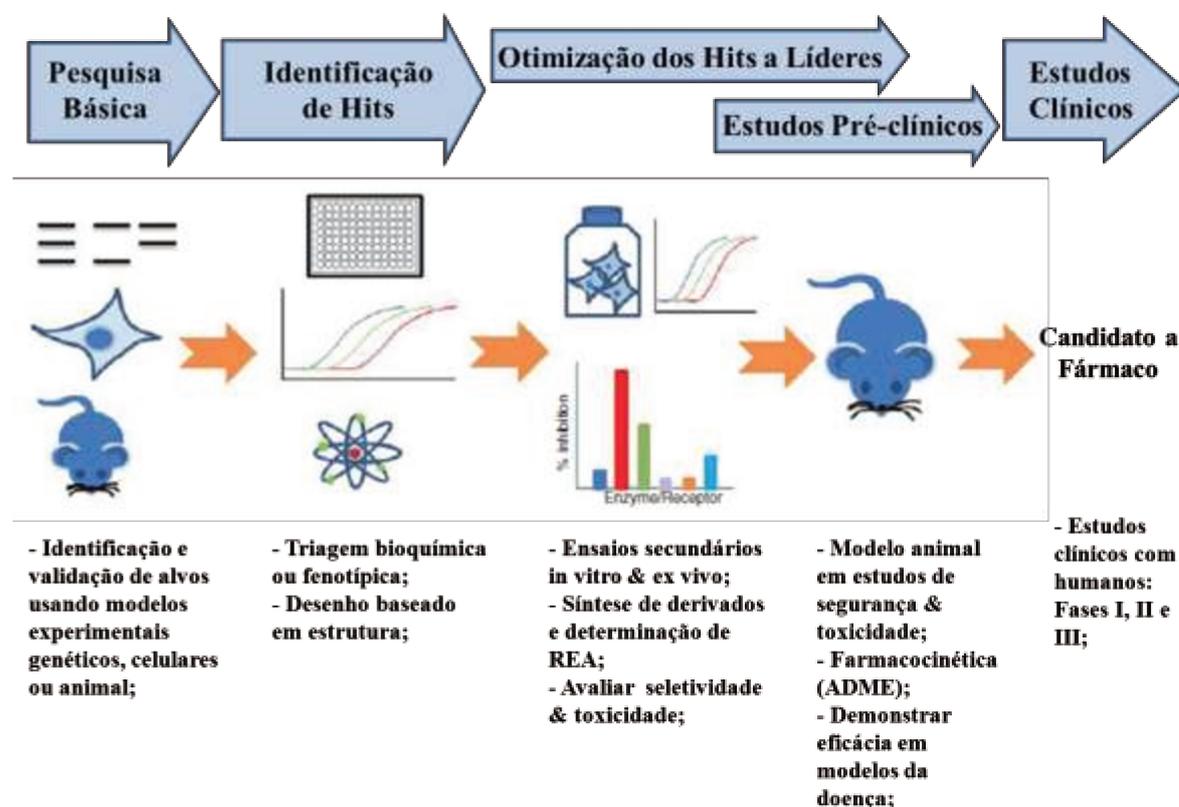
## 1 – Introdução e Objetivos

### 1.1 – Estágios Iniciais do Desenvolvimento de Fármacos

Desenvolver um novo fármaco, partindo da concepção da ideia até o lançamento de um produto inovador no mercado, é um processo complexo e interativo que pode levar até 15 anos e custar milhões de dólares.<sup>1,2</sup> O processo de desenvolvimento de fármacos pode ser dividido em duas fases, pré-clínicas e clínicas (Figura 1.1). Nas fases iniciais de desenvolvimento o objetivo primordial é coletar provas de princípio que justifiquem avançar uma série de moléculas bioativas nos longos e caros estudos clínicos. A primeira etapa do desenvolvimento racional de fármacos envolve *Pesquisas Básicas* (Figura 1.1), que visa a identificação e validação do alvo molecular. O alvo pode ser, por exemplo, uma proteína, gene ou RNA, deve ser acessível ao fármaco e uma vez que ocorra interação alvo-fármaco, uma resposta biológica com utilidade terapêutica deve ser desencadeada.<sup>1,2</sup>

Conhecimentos em bioquímica permitiram a identificação de novos alvos farmacológicos, que graças a novas técnicas moleculares poderiam ser isolados e estudados. Como exemplo podemos citar as enzimas, que receberam grande atenção como alvos moleculares, resultando no desenvolvimento de uma grande diversidade de inibidores enzimáticos com utilidade terapêutica.<sup>3,4</sup> A base do uso dos inibidores enzimáticos como fármacos é que a inibição de uma enzima adequada leva ao acúmulo de substrato ou diminuição da concentração do metabólito que leva a um efeito fenotípico desejado. Além disso, alvos relevantes para determinadas doenças podem ser identificados usando triagens fenotípicas.<sup>5</sup>

Tão importante quanto a seleção de um bom alvo para o desenvolvimento de fármacos<sup>6</sup> é o desenvolvimento de moléculas líderes (substâncias biologicamente ativas com propriedades físico-químicas e farmacocinéticas otimizadas). O processo de desenvolvimento de uma série de moléculas líderes se inicia com a *Identificação de Hits* (substâncias biologicamente ativas) (Figura 1.1). A química combinatória permitiu a síntese de vasta variedade de moléculas orgânicas, que por sua vez poderiam ser usadas nos ensaios de triagem biológica automatizada em larga escala (*HTS*, do inglês *high throughput screening*) para rápida identificação de hits.<sup>7-10</sup> Além disso, cristalografia de raios-X e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) podem ser empregadas na determinação da estrutura tridimensional de macromoléculas, permitindo o desenho racional de ligantes.<sup>1,2,11-13</sup>



**Figura 1.1** – Representação do processo de desenvolvimento de fármacos. Em destaque as etapas iniciais de pesquisa. **Abreviações:** *REA*, relação estrutura-atividade de uma série de moléculas bioativas; *ADME*, absorção, distribuição, metabolismo e excreção; *Hits*, molécula com atividade biológica; *Líder*, moléculas com atividade biológica e propriedades farmacocinéticas otimizadas. **Fonte:** adaptado de Hughes, 2011.<sup>2</sup>

Uma vez definida uma série de *hits*, inicia-se o processo de *Otimização dos Hits a Líderes* (Figura 1.1) com o objetivo de aumentar a potência e a seletividade das moléculas, que em última instância deve levar a uma maior segurança e tolerabilidade. Isso demanda realização de estudos concentração resposta, testes em ensaios secundários, determinação de relações estrutura-atividade preliminares e testes usando enzimas homólogas ao alvo. Estudos estruturais podem mais uma vez ser usados, agora visando mapear os determinantes da interação alvo-ligante facilitar a otimização tanto da potência quanto da seletividade. Em paralelo, ensaios celulares podem começar a ser empregados para avaliar eficácia (com modelo da doença) e a segurança (ensaios de citotoxicidade). Finalmente, a priorização das series de hits deve levar em consideração resultados de ensaios in vitro usados para prever propriedades farmacocinéticas e físico-químicas.<sup>2,11,12</sup>

Na fase de otimização dos hits para gerar líderes o objetivo principal é obter moléculas com potência, seletividade e perfil farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo e excreção) adequados para realização de *Estudos Pré-clínicos* (Figura 1.1). Nesta etapa os objetivos primordiais são demonstrar a eficácia de um candidato a fármaco em um modelo animal (in vivo). Um detalhado estudo das relações entre a estrutura e atividade deve ser realizado, incluindo efeitos na seletividade. Além disso, a atividade contra diferentes espécies costuma ser avaliada nesta fase do desenvolvimento. Na etapa final de otimização das moléculas líderes a preocupação é manter propriedades favoráveis otimizadas ao longo das etapas anteriores, bem como melhorar quaisquer deficiências remanescentes. Em geral, antes de prosseguir para estudos clínicos, as moléculas candidatas a fármacos passam por estudos de estabilidade, genotoxicidade, farmacodinâmica e farmacocinética, perfil de metabólitos gerados in vivo e alterações metabólicas induzidas pela(s) molécula(s).

## 1.2 – Doenças Negligenciadas

As doenças negligenciadas (DN) são doenças infecciosas que afetam bilhões de pessoas, majoritariamente em países em desenvolvimento de regiões tropicais e subtropicais, causando um grande impacto no bem-estar das populações afetadas. Uma vez que a propagação destas doenças esta diretamente relacionada a condições ambientais e socioeconômicas, as classes sociais menos favorecidas são as principais acometidas.<sup>14-17</sup>

Patógenos pertencentes a grupos biológicos bastante distintos são causadores de DN, incluindo protozoários, helmintos, bactérias e vírus.<sup>18</sup> A doença de Chagas e as leishmanioses são exemplos de DN causadas por protozoários flagelados unicelulares, (*Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp, respectivamente), pertencentes da família *Trypanosomatidae* e ordem *Kinetoplastida*. Os fármacos que são atualmente usados para tratamento destas enfermidades possuem limitações de toxicidade, variabilidade na eficácia, necessidade de administrações parenterais e/ou longos regimes de tratamento.<sup>19</sup> Tanto o mal de Chagas quanto as leishmanioses são endêmicas na América Latina e constituem um importante problema socioeconômico e de saúde pública no Brasil.<sup>17,19-21</sup>

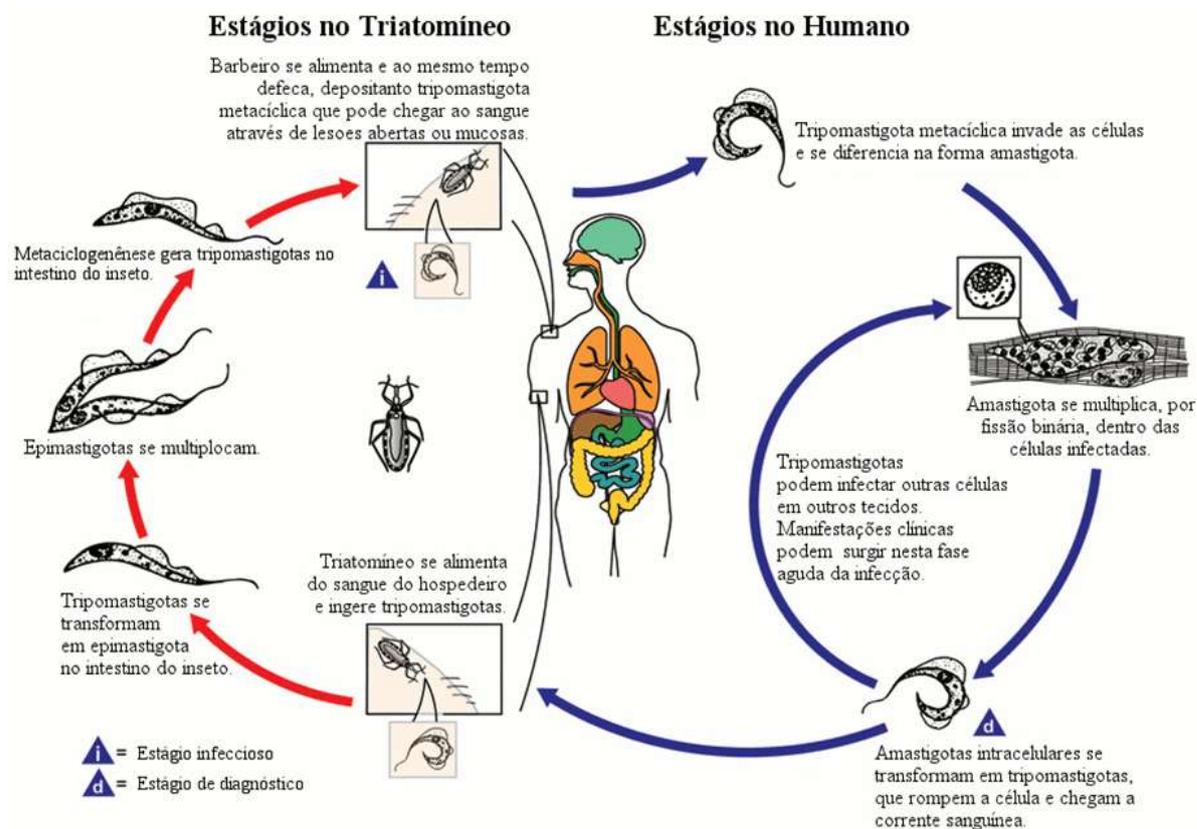
### 1.2.1 – Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, tem como agente etiológico o parasita *T. cruzi*. A doença de Chagas é endêmica na América Latina, mas

a imigração tem contribuído para que a doença se espalhe para outros continentes. Estima-se que 7-8 milhões de pessoas estejam infectadas com o protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* e que aproximadamente outros 25 milhões de pessoas correm risco de infecção.<sup>22</sup> Os mecanismos pelos quais o parasita é transmitido podem ser divididos em duas categorias: (i) primário, que inclui transmissão por insetos hematófagos, transfusão de sangue, ingestão de alimentos contendo fezes contaminadas do barbeiro ou congênita; e (ii) secundário, que inclui contaminações acidentais e ingestão de carne crua de animais infectados.<sup>23-25</sup>

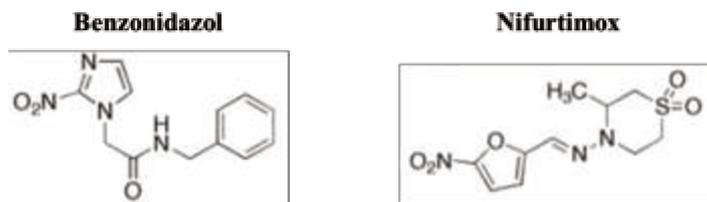
Dentre as espécies de triatomíneos (família *Reduviidae*), os principais vetores do *T. cruzi* pertencem aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Ao se alimentar do sangue do hospedeiro mamífero, o inseto vetor infectado deposita suas fezes contendo a forma tripomastigota metacíclica do parasita, que pode chegar a corrente sanguínea por feridas abertas ou mucosas (Figura 1.2). Os tripomastigotas metacíclicos são capazes de invadir as células do hospedeiro e se diferenciar na forma amastigota, que se multiplicam por divisão binária. Após multiplicação, o parasita se diferencia novamente na forma tripomastigotas dentro do citoplasma da célula hospedeira e quando são liberadas na corrente sanguínea passam a ter acesso a células de diferentes tecidos. Na fase aguda da doença, cada forma tripomastigota sanguínea pode invadir uma nova célula, iniciando um novo ciclo de diferenciação-multiplicação-infecção. Além disso, um novo inseto vetor pode se infectar ao se alimentar do sangue do hospedeiro e ingerir parasitas circulantes. No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas ingeridas se diferenciam em epimastigotas replicativas. Após se multiplicarem e migrarem para o intestino posterior do triatomíneo, os epimastigotas se transformam na forma infectiva tripomastigota metacíclica.<sup>26</sup>

As manifestações clínicas da fase aguda começam entre 6-10 dias após a infecção e podem durar de 1 a 2 meses. Frequentemente, envolve reações inflamatórias que podem levar a sintomas como febre, dores no corpo, inchaço de linfonodos e aumento de fígado e baço. Além disso, em alguns casos observa-se um edema no local da infecção, conhecido como chagoma, ou um inchaço nos olhos, chamado de sinal de Romana. A seguir, os pacientes entram em uma fase indeterminada, caracterizada pela ausência de qualquer sintoma e de parasitas no sangue. Finalmente, os pacientes que desenvolvem a fase crônica da doença vão apresentar patologias que podem ser letais, como cardiomiopatia, megaesôfago e megacolon.<sup>19</sup>



**Figura 1.2** – Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, causador do mal de Chagas. **Fonte:** figura adaptada do *Centers for Diseases and Control and Prevention*.<sup>26</sup>

O benzonidazol e o nifurtimox (Figura 1.3) são pró-fármacos que foram introduzidos cerca de 40 anos atrás e continuam sendo as únicas alternativas terapêuticas disponíveis no mercado. Ambos são moléculas nitroheterocíclicas que são ativados pela enzima tripanossomal nitroredutase do tipo 1, gerando metabólitos tóxicos para o parasita sem um significativa geração de superóxidos.<sup>27-29</sup> Entretanto, esses fármacos além de não apresentar perfis de segurança adequados, ainda apresentam uma eficácia limitada por serem efetivos apenas na fase aguda da doença. Além disso, a ocorrência de cepas naturalmente resistentes<sup>30</sup> e o desenvolvimento de resistência por parasitas expostos à droga<sup>31</sup> tem sido reportado. Deste modo, fica claro que existe uma demanda urgente por fármacos que atendam as necessidades clínicas não satisfeitas pelo benzonidazol e nifurtimox.<sup>32</sup>



**Figura 1.3** – Fármacos usados no tratamento da fase aguda da doença de Chagas. Tanto o benzonidazol quanto o nifurtimox são nitro-heterocíclicos com perfis de segurança e eficácia inadequados.

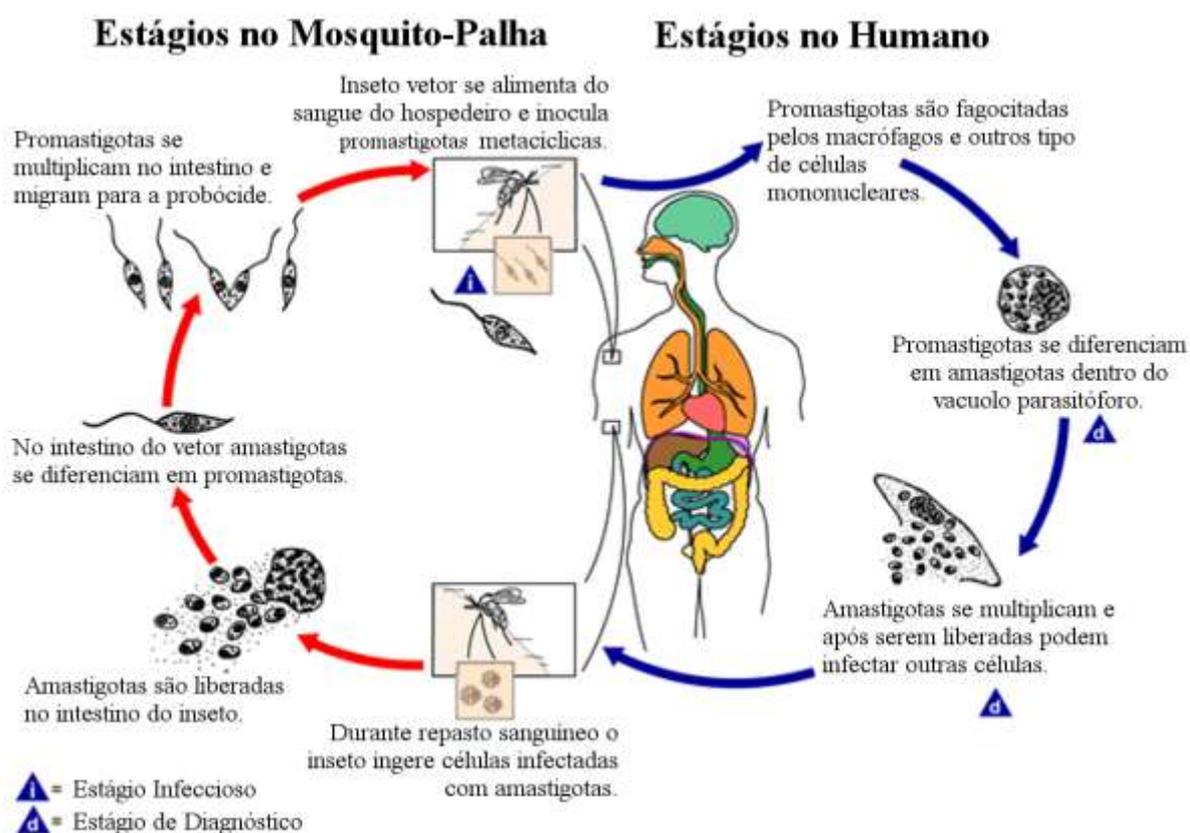
Atualmente, alguns fármacos contra doenças de Chagas estão em fase de desenvolvimento.<sup>33</sup> Foi demonstrado que antifúngicos baseados em azóis, como por exemplo o posaconazol, são capazes de inibir a enzima esterol-14- $\alpha$ -desmetilase (CYP51), um sistema enzimático dependente do citocromo P450, levando ao acúmulo de 14- $\alpha$ -metilsteróis e prejudicando a biossíntese de ergosterol na membrana citoplasmática.<sup>34</sup> Assim, moléculas pertencentes a classe química dos azóis estão em fase clínica de desenvolvimento. Amiodarona e dronedarona, fármacos inicialmente desenvolvidos para tratamento de arritmia em humanos, mostraram ser capazes de levar o parasita *T. cruzi* à morte, tanto em cultura de células como em modelos animais, tendo uma ação poli-farmacológica ao perturbar a homeostase de cálcio e inibir a biossíntese de ergosterol.<sup>35</sup> Além disso, inibidores reversíveis da enzima cruzipaina tiveram efeito tripanocida em ensaios *in vitro* e *in vivo* usando modelo murino da infecção aguda por *T. cruzi*.<sup>36</sup> Apesar da importância do esforço feito nos trabalhos mencionados é notável que o número de alvos atualmente explorados para o desenvolvimento de fármacos antichagásicos ainda é limitado. Deste modo, continuam sendo necessárias iniciativas que incluem validação de novos alvos e etapas iniciais de desenvolvimento de fármacos.<sup>37,38</sup>

### 1.2.2 - Leishmanioses

As leishmanioses são um grupo de doenças infecciosas causadas por mais de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania*, sendo endêmica em mais de 90 países da América Central e Latina, Ásia, África e Europa.<sup>19,39</sup> Estima-se que 0,9-1,6 milhões de pessoas sejam infectadas anualmente, com 310 milhões de pessoas correndo risco de infecção. O número de mortes anuais resultantes da infecção por *Leishmania* spp. é superior a 20.000 indivíduos.<sup>40,41</sup>

O parasita pode ser transmitido pela picada de fêmeas de flebotomíneos (popularmente conhecidos como mosquito-palha), insetos dípteros pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e

*Phlebotomus* da família *Psychodidae*. Outras formas de infecção envolvem sangue ou órgãos infectados, transmissão congênita e contaminações acidentais.<sup>39,42</sup> A transmissão envolvendo o mosquito palha se inicia quando o inseto infectado se alimenta do sangue do hospedeiro mamífero, inoculando promastigotas metacíclicas presentes na sua probólide (Figura 1.4). As formas infectivas promastigotas são fagocitadas por macrófagos ou outras células mononucleares fagocitárias e se diferenciam na forma amastigota. Dentro do fagolisossomo, a forma amastigota se multiplica por divisão binária. Após rompimento da célula hospedeira os amastigotas são liberados e novamente internalizados por células mononucleares fagocitárias. Um novo inseto vetor pode se infectar durante repasto sanguíneo ao ingerir células infectadas com amastigotas. No estômago do mosquito, os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas que se diferenciam em promastigotas procíclicas. Após se multiplicarem, os promastigotas migram para as porções anteriores do aparelho digestivo do inseto e invadem a probólide. Durante a migração as promastigotas procíclicas sofrem metacíclogênese, gerando formas promastigotas metacíclicas infectantes.<sup>39,41,42</sup>



**Figura 1.4** – Ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp., agente causador das leishmanioses.

**Fonte:** figura adaptada do *Centers for Diseases and Control and Prevention*.<sup>41</sup>

Existem diferentes formas de manifestações clínicas das leishmanioses, sendo a visceral (LV, também conhecida como calazar), cutânea (LC, também conhecida como

leishmaniose tegumentar americana ou úlcera de Bauru) e a mucocutânea (LMC) as principais formas. A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença, caracterizada por lesões múltiplas na derme. As lesões tipicamente surgem após semanas ou até meses depois da picada do mosquito palha. A leishmaniose mucocutânea pode levar a destruição parcial ou total de membranas mucosas do nariz, boca e garganta. LMC ocorre principalmente na Bolívia, Brasil e Peru, onde é famosa por conta das sequelas deixadas. Finalmente, a leishmaniose visceral, forma mais grave da doença, podendo afetar vários órgãos internos e levando a morte se não tratada. A doença se desenvolve tipicamente alguns meses após a picada do vetor e as manifestações clínicas incluem febre, perda de peso, inchaço de órgãos e redução na contagem de células. Outras formas que são mais raramente observadas são a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e dérmica pos-calazar (LDPK).<sup>39-43</sup> Na tabela 1.1 as espécies de *Leishmania* responsáveis por levar a diferentes manifestações clínicas.

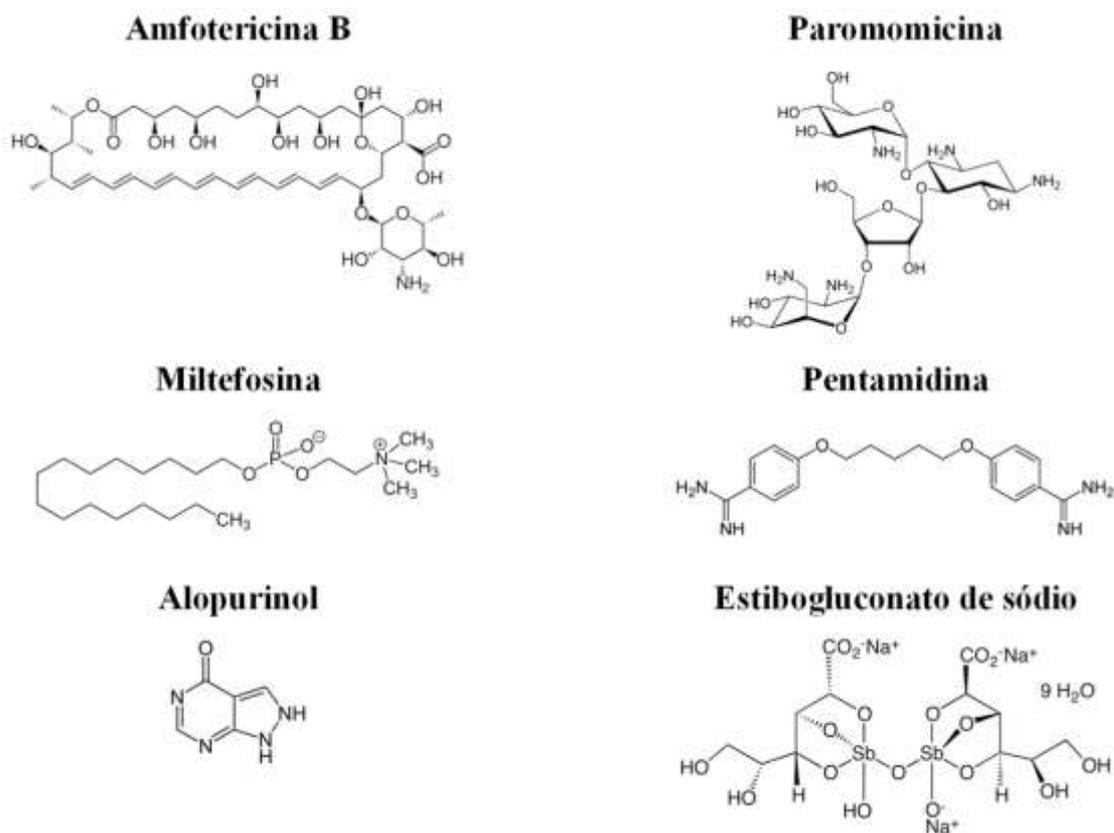
**Tabela 1.1** – Formas de doença causadas pelas principais espécies de *Leishmania*. Os parasitas pertencentes ao subgênero *L. (Leishmania)* se desenvolvem no intestino médio e anterior dos flebotomíneos, enquanto os do subgênero *L. (Viannia)* se desenvolvem no intestino posterior do inseto.<sup>39,42,43</sup>

Subgênero	Complexo	Espécie	Região <sup>a</sup>	Manifestações Clínicas <sup>b</sup>
<i>Leishmania</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	VM	LC, LV, LDPK, LM
		<i>L. chagasi</i> ( <i>L. infantum</i> )	NM e VM	LC, LV, LDPK, LM
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>	NM	LC, LCD
		<i>L. amazonensis</i>	NM	LC, LCD, LM, LV, LDPK
		<i>L. venezuelensis</i>	NM	LC, LCD
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	VM	LC, LM, LV
		<i>L. major</i>	VM	LC, LM
		<i>L. aethiopica</i>	VM	LC, LCD
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	NM	LC, LM, LV
		<i>L. guyanensis</i>	NM	LC, LM
		<i>L. panamensis</i>	NM	LC, LM
		<i>L. peruviana</i>	NM	LC

<sup>a</sup> – VM, velho mundo; NM, novo mundo.

<sup>b</sup> – Formas Clínicas das Leishmanioses: LC, cutânea; LCD, cutânea difusa; LM, mucocutânea, LV, visceral; e LDPK, dérmica pos-calazar;

Os medicamentos disponíveis para leishmanioses (Figura 1.5) estão longe do ideal, podendo apresentar problemas relacionados à toxicidade, alto custo, falta de eficácia, dificuldade de administração e desenvolvimento de resistência (Tabela 1.2). Os antimoniais pentavalentes constituem o tratamento padrão da LV desde 1940, entretanto fatores como toxicidade e surgimento de resistência levaram a introdução de alternativas terapêuticas como a anfotericina B. O desenvolvimento da miltefosina representou um grande avanço no tratamento de LV, já que pode ser administrado por via oral e apresenta segurança para crianças. Antimoniais ou paromomicina são alternativas terapêuticas para LC do Novo Mundo, mas estes fármacos apresentam variabilidade em sua eficácia. No caso de LCD, LM e LDPK, terapias sistêmicas são consideradas.<sup>19,39,42</sup>



**Figura 1.5** – Fármacos usados no tratamento das Leishmanioses. Amfotericina B, paromomicina, miltefosina, pentamidina, allopurinol e estibogluconato de sódio (Pentostam). Pentostam é um exemplo dos antimoniais pentavalentes, que pode incluir ainda antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime).

**Tabela 1.2** – Fármacos usados no tratamento das leishmanioses.<sup>19,39,44</sup>

<b>Fármaco<sup>a</sup></b>	<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Vias<sup>b</sup></b>	<b>Indicação e Problemas</b>
Antimoniais Pentavalentes	Possível inibição da glicólise, oxidação de ácidos graxos e formação de ATP/GTP	IM, EV, IL	LV, LC, LM, LDPK; Tratamentos longos, desenvolvimento de resistência, eficácia variável, toxicidade hepática, renal e cardíaca;
Anfotericina B e formulações lipídicas	Interage com esteróis da membranas plasmática induzindo formação de poros	EV	LV, LC, LM, LDPK; Eficácia variável, dificuldade de administração, custo, degradação acima de 25 °C, nefrotoxicidade, febre durante infusões;
Miltefosina	Possíveis alterações na síntese da ancora glicosilfosfatidilinositol, metabolismo de lipídios, transdução de sinal e acil-CoA acil-transferase	Oral	LC, LV LDPK; Toxicidade hepática e renal, distúrbios gastrointestinais, teratogenicidade, custo, potencial desenvolvimento de resistência, tratamento longos;
Paromomicina	Interage com sítio-A de ribossomos inibindo a síntese de proteínas	IM, tópica	LC, LV; Irritante para pele, eficácia variada, toxicidade para fígado e rins, ototoxicidade;
Pentamidina	Inibição da biossíntese de poliaminas; Perturbação do potencial de membrana mitocondrial	IM, IL	LC, LM; Desenvolvimento de resistência, eficácia variável, toxicidade para pâncreas, disfunções cardíacas e renais;
Allopurinol	Interage com a enzima Xantina Oxidase inibindo a biossíntese de purinas	Oral	LC, LV; Erupções cutâneas, eficaz apenas se combinado com Pentostam;

<sup>a</sup> – Estruturas apresentadas na figura 1.5. <sup>b</sup> Vias de administração: IM, intramuscular; EV, endovenoso; IL, injeção intralésional;

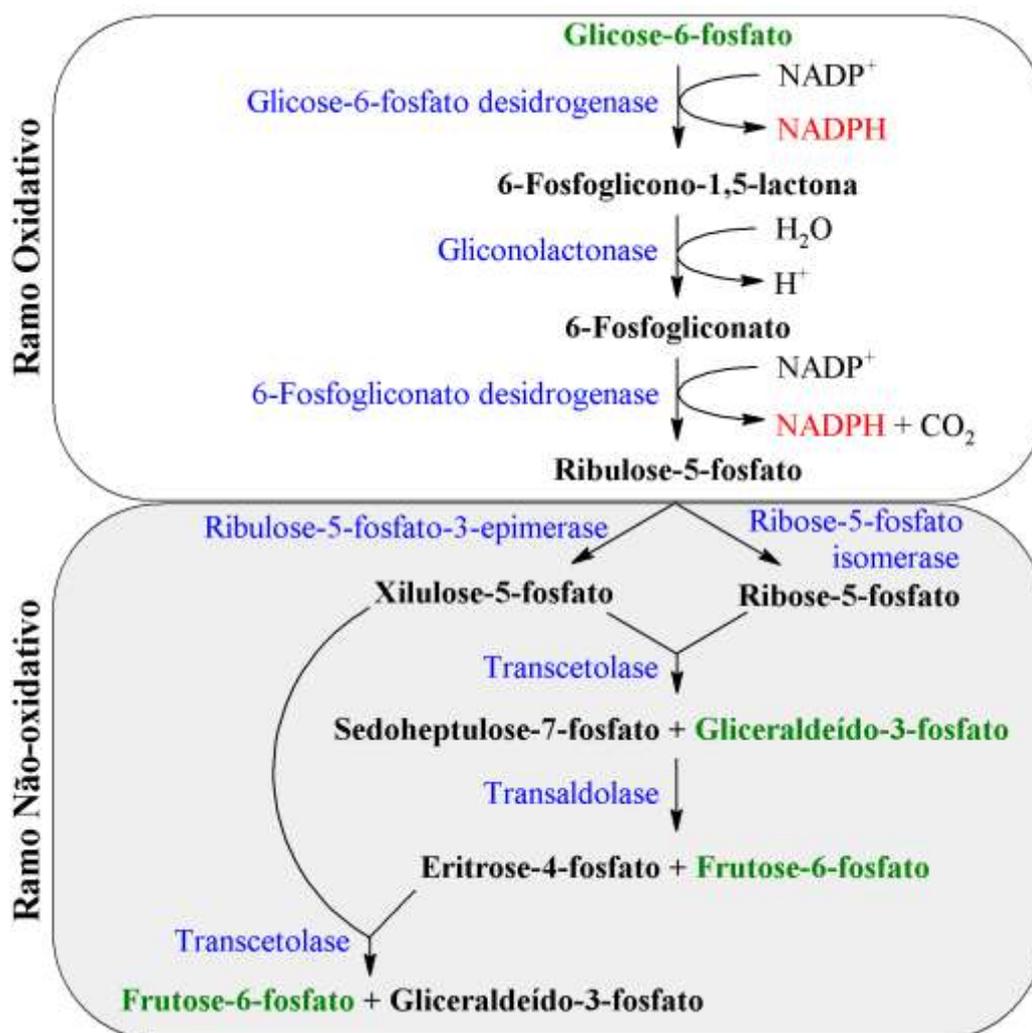
### 1.3 – Metabolismo Energético de Tripanosomatídeos e a Via de Pentoses

Boa parte dos conhecimentos sobre o metabolismo energético dos tripanosomatídeos vem de estudos com o parasita *Trypanosoma brucei*, em especial porque nestes parasitos a expressão de genes pode ser suprimida por RNA de interferência (RNAi), ao contrário do que

acontece com *T. cruzi* e *Leishmania* spp.<sup>45</sup> Conforme apresentado nas seções anteriores, os tripanosomatídeos que causam doenças humanas possuem um ciclo de vida complexo, que envolve vários estágios de desenvolvimento em diferentes hospedeiros. Sendo assim, esses parasitos devem ser capazes de adaptar o seu metabolismo dependendo da fonte de carbono disponível.<sup>46,47</sup> Em princípio, três diferentes classes de substratos poderiam ser utilizadas como fonte de carbono: carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. Assim, as formas tripomastigotas de *T. cruzi* e *T. brucei* são altamente dependentes de glicose, encontrada em abundância na corrente sanguínea de hospedeiros vertebrados. Já as formas encontradas no intestino de insetos vetores (epimastigotas de *T. cruzi*, tripomastigotas procíclicas de *T. brucei* e promastigotas de *Leishmania* spp.) são adaptadas para também utilizar aminoácidos como fonte de energia, já que em determinados momentos a oferta por carboidratos pode ser escassa. De maneira similar, as formas amastigotas de *T. cruzi* e *Leishmania* encontram pouca glicose livre disponível no ambiente intracelular e portanto, também devem usar aminoácidos (especialmente prolina e glutamina) como substratos para metabolismo. Finalmente, acreditasse que as formas amastigotas poderiam usar ácidos graxos como fonte alternativa de energia.<sup>48,49</sup>

Quando utilizam carboidratos como fonte de energia, os tripanosomatídeos metabolizam a glicose majoritariamente pelas vias glicolítica e de pentose fosfato. Enquanto a via glicolítica tem como papel fundamental a produção de ATP,<sup>50</sup> a via de pentoses produz agentes redutores e intermediários metabólicos importantes para vários processos catabólicos e para manutenção do balanço oxidato.<sup>51-54</sup> Na ausência de glicose, aminoácidos (e/ou ácidos graxos) são metabolizados pelos tripanosomatídeos através de fosforilação oxidativa, importante para produção de ATP, levando a formação de fosfoenolpiruvato que pode entrar na via gliconeogênica para produção de carboidratos.<sup>46-48,55</sup> A via gliconeogênica, além de ser importante para manter a produção de glicoconjugados, também mantém o fluxo na via de pentoses-fosfato através da formação de glicose 6-fosfato.<sup>56-58</sup>

A via de pentoses pode ser dividida em dois ramos, oxidativos e não-oxidativos, com funções bastante distintas (Figura 1.6). O NADPH gerado no ramo oxidativo da via de pentoses fosfato é usado como um agente redutor essencial para a manutenção do balanço oxidativo e para a biossíntese de lipídeos (especialmente ácidos graxos e esteroides). Por sua vez, o braço não oxidativo produz uma variedade de intermediários metabólicos que inclui ribose-5-fosfato e eritrose-4-fosfato, usados na biogênese de nucleotídeos e como precursor na produção de coenzimas e amino ácidos aromáticos, respectivamente.



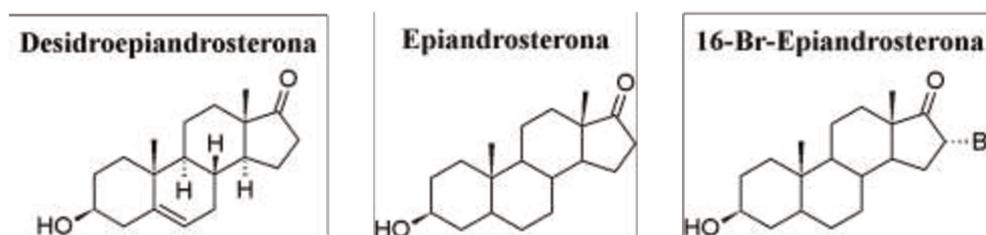
**Figura 1.6** – Representação esquemática da via de pentose fosfatos. NADPH (vermelho) gerado no ramo oxidativo é usado na proteção contra stress oxidativo e biossíntese de lipídeos. Ribose-5-fosfato participa da biogênese de nucleotídeos e eritrose-4-fosfato é precursor de coenzimas e amino ácidos aromáticos. Glicose-6-fosfato, Frutose-6-fosfato e Gliceraldeído-3-fosfato, em verde, são compartilhadas com a via glicolítica.

Por conta do importante papel que a via de pentoses exerce nos tripanosomatídeos, enzimas desta rota metabólica têm sido consideradas alvos interessantes para o desenvolvimento de fármacos antiparasitários.<sup>53,59</sup> Essa idéia é reforçada pelo fato de inibidores desenhados para a enzima 6PGDH (6-Fosfogliconato Desidrogenase) de *T. brucei* afetarem tanto a proliferação de formas trypomastigotas deste parasito, quanto as formas amastigotas de *Leishmania* e *T. cruzi*.<sup>60</sup> Além disso, a inibição da enzima G6PDH mostrou ser capaz de afetar o crescimento de tripanosomas<sup>61</sup> e do agente causador da malária, *Plasmodium falciparum*.<sup>62,63</sup>



levedura. As G6PDHs de mamíferos possuem uma identidade sequencial de aproximadamente 50%, 40% e 50% com relação às proteínas de plantas, bactérias e leveduras, respectivamente. Além disso, os esteroides não mostraram efeito sobre outras duas enzimas de mamíferos produtoras de NADPH, nomeadas isocitrato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase. Posteriormente, a caracterização da interação G6PDH-esteróides revelou um mecanismo de inibição incompetitivo com relação ao substrato e ao cofator.<sup>76,77</sup> Apesar de não revelar o sítio de interação dos inibidores incompetitivos da G6PDH, que continua desconhecido até o presente, esses trabalhos mostravam que esse tipo de inibidor poderia apresentar especificidade para enzimas de diferentes espécies. Estudos mais recentes com derivados halogenados da desidroepiandrosterona (DHEA) estabeleceram os esteróides inibidores da G6PDH como uma promissora classe química para o desenvolvimento de novos fármacos contra câncer e obesidade.<sup>78</sup>

A G6PDH humana possui uma identidade de 46, 48 e 50 % com as proteínas homólogas de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. mexicana*. Tão logo nosso grupo iniciou os trabalhos com as G6PDHs de tripanosomatídeos, verificou-se que DHEA, epiandrosterona (EA) e 16- $\alpha$ -bromo-EA (16BrEA) (Figura 1.8) também são inibidores incompetitivo tanto da G6PDH de *T. cruzi* quanto da enzima de *T. brucei*.<sup>73,74</sup> Os derivados de DHEA também se mostraram capazes de matar os parasitas *T. brucei* quanto *T. cruzi* in vitro. Entretanto, essas mesmas moléculas não foram capazes de inibir a G6PDH de *Leishmania*, possivelmente por restrições impostas pelo ainda desconhecido sítio de interação de inibidores incompetitivos, tão pouco afetaram o crescimento de *L. mexicana* in vitro.<sup>73</sup> Os inibidores de G6PDH pertencentes a classe dos esteroides, especialmente derivados halogenados, mostraram valores de  $IC_{50}$  que chegavam à faixa de concentração submicromolar.<sup>74</sup> Esse fato sugere que o sítio de interação dos inibidores incompetitivos nas G6PDHs é *druggable*, ou seja, suscetível a interagir com moléculas com características de fármacos com alta afinidade.



**Figura 1.8** – Estrutura dos esteroides que atuam como inibidores incompetitivos da G6PDH.

Apesar dos promissores resultados obtidos com DHEA e seus derivados sobre parasitas do gênero *Trypanosoma*, esses esteroides apresentam algumas limitações. Conforme mencionado anteriormente, os esteroides são potentes inibidores da G6PDH humana (*HsG6PDH*)<sup>79</sup> e a falta de seletividade, possivelmente imposta pela classe química, pode limitar o uso destas moléculas para tratamento de Chagas. Efeitos adversos no hospedeiro humano devido a inibição da *HsG6PDH* podem incluir desde episódios de anemia hemolítica até alterações metabólicas. Outro efeito indesejado que poderia estar associado a classe química dos esteroides são efeitos androgênicos induzidos em seres humanos. Além disso, os derivados de DHEA não inibem a G6PDH de *L. mexicana* (*LmG6PDH*),<sup>72,74</sup> uma notável observação uma vez que a *LmG6PDH* possui uma identidade com as enzimas homólogas de *T. brucei* e *T. cruzi* de 62 e 64 %, respectivamente, bem como de 50% com a enzima de humanos. Até o presente momento não existem inibidores das G6PDHs de *Leishmania* que possam ser usados como sondas químicas para estudar a importância desta enzima para os parasitas. Sendo assim, a identificação de novos inibidores não-esteroidais da G6PDH de *T. cruzi* e *Leishmania* são altamente desejados, especialmente se estes inibidores apresentarem seletividade para a enzima do parasita sobre a enzima humana. A distinta susceptibilidade das G6PDHs de tripanosomatídeos à inibição por derivados de DHEA, onde as enzimas de tripanosoma são inibidas e de *Leishmania* não, sugere que seria possível desenvolver inibidores incompetitivos seletivos para G6PDHs de diferentes espécies.

Devido ao importante papel biológico da G6PDH e o potencial desta enzima como alvo para desenvolvimento de fármaco, estudos de caracterização estrutural destas enzimas tem sido realizados. Atualmente, as estruturas das G6PDHs de *Leuconostoc mesenteroides* (*LmesG6PDH*), *Mycobacterium avium* (*MaG6PDH*), humanos (*HsG6PDH*) e *T. cruzi* (*TcG6PDH*) estão disponíveis na base de dados de proteínas (PDB; do inglês, *Protein Data Bank*).<sup>80</sup> Entretanto, a maior parte do conhecimento estrutural sobre as G6PDHs foi estabelecido em estudos com a *Lmes*- e *HsG6PDH*. Trabalhos com a *LmesG6PDH* recombinante revelaram que a estrutura quaternária da enzima bacteriana é dimérica e que cada subunidade é composta por dois domínios, sendo um do tipo Rossmann e outro  $\beta+\alpha$ .<sup>81</sup> Estudos de mutagênese sítio-dirigidas com a *LmesG6PDH* revelaram os sítios de ligação do substrato (G6P) e do cofator (NADP<sup>+</sup>), bem como informaram sobre o mecanismo de catalise destas enzimas.<sup>82-84</sup> Por sua vez, a estrutura cristalográfica da *HsG6PDH* revelou não só uma estrutura quaternária tetramérica inédita, como a ligação de um NADP<sup>+</sup> adicional ao domínio  $\beta+\alpha$  que se tornou conhecido como NADP<sup>+</sup> estrutural.<sup>85,86</sup> Após um intervalo de seis anos, Ortiz e colaboradores descreveram a cristalização da forma curta da *TcG6PDH*<sup>87</sup> (*TcG6PDH*-

S, Met38 até Ala555) e disponibilizaram as coordenadas da forma apo (PDB 4E9I; resolução de 2,85 Å) e do complexo enzima-substrato (PDB 4EM5; resolução de 3,35 Å). Mais recentemente o Centro de Genômica Estrutural para Doenças Infecciosas de Seattle (em inglês, *Seattle Structural Genomic Centre for Infectious Diseases*) depositou a estrutura da *MaG6PDH* (código PDB: 4LGV) a uma resolução de 2,3 Å.<sup>88</sup> Até o presente momento, nenhuma discussão detalhada sobre as estruturas da *Ma*- e *TcG6PDH* foi publicada, de modo que não há na literatura discussões sobre diferenças entre as enzimas de patógenos e hospedeiro, como diferenças nas bases moleculares de reconhecimento do G6P e NADP(H) ou a presença de sítios acessórios próximos ao sítio de interação dos substratos, que poderiam ser exploradas para o desenvolvimento guiado pela estrutura de inibidores seletivos.

#### 1.4 – Construção da Hipótese e Objetivos

Recentemente, novos inibidores da *HsG6PDH*<sup>89</sup> e da enzima bifuncional glicose-6-fosfato desidrogenase 6-fosfogliconolactonase de *Plasmodium falciparum* (*PfGluPho*)<sup>63</sup> foram identificados por HTS. Entretanto, nenhum inibidor incompetitivo foi reportado nestes trabalhos. Considerando que o sítio para inibidores incompetitivos na *TcG6PDH* é um sítio *druggable*, seria esperado identificar inibidores potentes desta enzima em uma campanha de HTS. Além disso, o uso de uma coleção de moléculas orgânicas com alta diversidade química possivelmente facilitaria a identificação de inibidores incompetitivos das G6PDHs com um esqueleto químico distinto dos esteróides. Hipoteticamente, inibidores de outras classes químicas poderiam alcançar uma seletividade para G6PDH do parasita ainda não observada dentre os esteróides, talvez por restrições da classe química e ainda apresentar atividade sobre a *LmG6PDH*.

Deste modo, nosso objetivo geral era identificar inibidores incompetitivos da G6PDH que possuíssem um esqueleto químico distintos dos esteróides, que fossem seletivos para a G6PDH de tripanossomatídeos e capazes de modular a atividade da enzima de *Leishmania*. Nossos objetivos específicos contemplavam os seguintes tópicos:

- ✓ Identificar novos inibidores não-esteroidais da G6PDH de *T. cruzi* mediante a realização de uma campanha de HTS usando uma coleção de moléculas orgânicas diversas;

- ✓ Caracterizar os *hits* identificados por HTS, determinando parâmetros como potência ( $IC_{50}$ ), mecanismo de inibição, seletividade frente a enzima humana e relações entre a estrutura e a atividade;
- ✓ Caracterizar as moléculas ativas contra a G6PDH de *L. mexicana*;
- ✓ Avaliar o efeito tripanocida in vitro dos inibidores identificados para a TcG6PDH sobre a forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ Determinar a estrutura cristalográfica da G6PDH de tripanossomatídeos visando a mapear o sítio dos inibidores incompetitivos ou identificar diferenças com relação a enzima humana que possam ser exploradas no desenvolvimento de inibidores seletivos.

# Capítulo 2

*Metodología*

## 2 – Metodologia

### 2.1 – Identificação e Caracterização de Inibidores da G6PDH de *T. cruzi*

#### 2.1.1 – Produção e Purificação da G6PDH de *T. cruzi* e Humana usadas na Identificação e Caracterização de Novos Inibidores

A proteína TcG6PDH utilizada nas etapas de identificação e caracterização de novos inibidores era rotineiramente produzida em nosso laboratório. Para isso, células competentes de *Escherichia coli* BL21 (DE3) eram transformadas com um vetor de expressão pET28a que continha o gene da G6PDH de *T. cruzi* (TcG6PDH) cepa CL Brener (GenBank: XM\_814967.1), clonado usando as enzimas NheI e XhoI.<sup>90</sup> Essas bactérias eram cultivadas a 20 °C sob agitação de 200 rpm em meio auto-indutor ZYM-5052<sup>91</sup> (0,5 L em erlenmeyers de 2L) contendo canamicina 50 µg.mL<sup>-1</sup>. Após um período de 48h, a cultura foi centrifugada (10.000 g, 4 °C, 15 minutos), o sobrenadante descartado e as células suspensas em tampão A1 (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl e 10 mM Imidazol). A lise das bactérias foi efetuada incubando as células com lisozima (2 mg por grama de pellet; incubação a 4 °C por cerca de 30 minutos), seguida de lise mecânica com o sonicador Sonics Vibra Cell VCX-500 (ciclos de 10 segundos de pulso com 10 segundos de repouso, por 25 minutos e amplitude de 40%). O lisado bacteriano foi clarificado por centrifugação (40.000 g, 45 min, 4 °C) e a fração solúvel filtrada com filtro de 0,45 µm para ser utilizada na etapa de purificação.

No primeiro passo da purificação da TcG6PDH, aplicou-se a fração solúvel do extrato celular uma resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen) montada em uma coluna de gravidade. A resina foi lavada com tampão A1 contendo 40 mM e 80 mM de imidazol, para então a TcG6PDH ser eluída aumentando a concentração de imidazol no tampão A1 para 400 mM. As frações contendo a TcG6PDH foram transferidas para um concentrador do tipo Centricon (MWCO 30 kDa) e a amostra concentrada por centrifugação (3.000 g, 4 °C). A amostra concentrada foi submetida a uma cromatografia de exclusão por tamanho molecular usando uma coluna HiLoad Superdex 200 16/60 (GE HealthCare) acoplada a um sistema AKTA Purifier (GE Healthcare) e o tampão GF1 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 200 mM NaCl). As frações contendo a TcG6PDH foram reunidas, concentradas e quantificada por absorbância a 280 nm. A proteína foi armazenada a -80 °C com 20% de glicerol.

Um fragmento da proteína G6PDH de *H. sapiens* (HsΔG6PDH, Ser29 a Asn511) foi

utilizada em ensaios de inibição para avaliar se os inibidores identificados para a *TcG6PDH* tinham efeito sobre a enzima homóloga humana. A clonagem, produção e purificação da *HsΔG6PDH* foi realizada pelo aluno de doutorado Américo Tavares Ranzani.<sup>92</sup> A sequência de nucleotídeos codificando a *HsΔG6PDH* foi clonada entre as enzimas *EcoRI* e *XhoI* de um vetor de expressão pET28 modificado (pET-SUMO), que codifica a proteína SUMO em N-terminal (Figura 2.1). A construção pET-SUMO\_ *HsΔG6PDH* foi utilizada para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) competentes e essas bactérias usadas para produzir a *HsΔG6PDH*, com uma cauda His-SUMO em N-terminal, usando o mesmo protocolo descrito para a *TcG6PDH*. Após lise das bactérias e clarificação da amostra por centrifugação, a fração solúvel do extrato celular foi transferida para uma resina de níquel (Ni-NTA, Qiagen). A resina foi extensivamente lavada com tampão A1 e a cauda His-SUMO clivada incubando a resina com a protease ULP-1 (12h à 4°C, sob agitação). A *HsΔG6PDH* clivada foi eluída da resina com tampão A1, concentrada e submetida a uma etapa final de purificação por cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna HiLoad Superdex 200 16/60 (GE Healthcare) e o tampão GF1 usado como fase móvel. A concentração da proteína foi quantificada por absorbância a 280 nm e a amostra armazenada a -80 °C com 20% de glicerol.

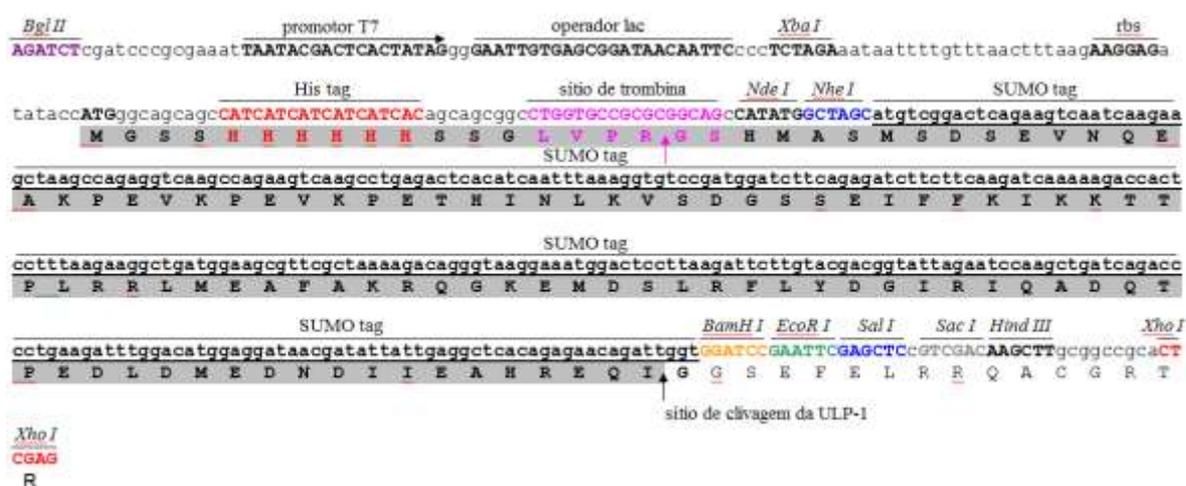


Figura 2.1 – Mapa do vetor pET-SUMO, modificado a partir do vetor pET28. A sequência de nucleotídeos que codifica para a proteína SUMO foi inserida entre os sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *NheI* e *BamHI*.

### 2.1.2 – Avaliação da Atividade da *TcG6PDH*

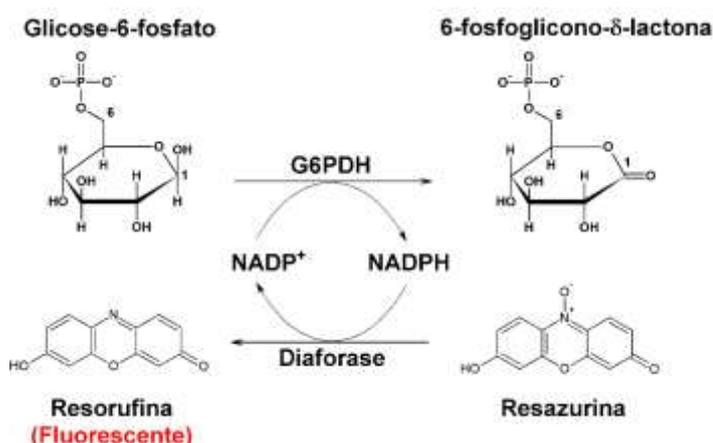
A atividade da *TcG6PDH* foi acompanhada seguindo a formação de NADPH ao longo do tempo por medidas de fluorescência ( $\lambda_{Exc/Em}$ : 340 nm / 460 nm), usando um leitor de

microplacas (CLARIOstar, BMG LABTECH). Os experimentos foram realizados em placas pretas de 96 poços (Greiner), usando tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100. As reações foram feitas em triplicata a 25 °C, com um volume final de 100 µL por poço. Os parâmetros catalíticos da *TcG6PDH* foram obtidos variando a concentração do G6P de 2 mM a 15,6 µM e de NADP<sup>+</sup> de 100 µM a 1,56 µM, enquanto o outro substrato foi mantido a concentrações saturantes de 200 µM e 2 mM para o NADP<sup>+</sup> e G6P, respectivamente. A concentração de *TcG6PDH* foi mantida à 1 nM. Os valores aparentes para a constante de Michaelis-Menten ( $K_m^{app}$ ) e velocidade máxima de reação ( $V_{max}^{app}$ ) foram calculados por regressão não-linear dos dados, no programa GraphPad Prism, usando a equação:

$$v = (V_{max}^{app} \times [S]) / (K_m^{app} + [S]), \quad (2.1)$$

onde  $v$  é a velocidade inicial de reação medida nas diferentes concentrações de substrato  $[S]$ .

Nos ensaios de triagem de inibidores e determinação do  $IC_{50}$  das moléculas ativas a reação da *TcG6PDH* foi acoplado ao sistema amplificador diaforase-resazurina (Figura 2.1). Neste ensaio, a enzima diaforase (E.C. 1.8.1.4) de *Clostridium kluyveri* usa o NADPH formado pela G6PDH para converter resazurina a resorufina, um fluóforo de alto rendimento quântico com fluorescência na região do vermelho.



**Figura 2.2** – Esquema da reação *TcG6PDH* acoplada ao sistema diaforase-resazurina usado nos ensaios de HTS.

Para determinar a faixa de concentração de DMSO que poderia ser usada nos ensaios acoplados com a *TcG6PDH*, preparou-se uma reação onde a porcentagem deste solvente

variava de 10 a 0,5 % (v/v). A atividade da *TcG6PDH* foi acompanhada seguindo a formação de resorufina por medidas de fluorescência ( $\lambda_{\text{Exc/Em}}$ : 545-20 nm / 600-40 nm), usando o leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH). Os experimentos foram realizados em placas pretas de 384 poços (Greiner), usando tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100. As reações foram feitas em quadruplicata à 25 °C em um volume de 50  $\mu\text{L}$  por poço. As concentrações finais foram G6P 400  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NADP}^+$  40  $\mu\text{M}$ , diaforase 1U.mL<sup>-1</sup>, resazurina 10  $\mu\text{M}$  e *TcG6PDH* 1 nM. Controles positivos (100% de atividade) e negativos (0% de atividade) foram feitos sem adição de DMSO e enzima, respectivamente.

Os valores de  $IC_{50}$  dos esteroides DHEA, EA e 16BrEA foi determinado usando o ensaio acoplado da *TcG6PDH*. Uma diluição seriada dos inibidores foi feita usando um fator de 0,4, de modo que as concentrações finais de DHEA e EA estavam entre 80 e 0,13  $\mu\text{M}$ , enquanto o 16BrEA foi ensaiado na faixa de 4  $\mu\text{M}$  a 6,5 nM. A concentração final de DMSO foi de 8%. A reação foi monitorada seguindo a formação de resorufina usando o leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH) no modo fluorescência ( $\lambda_{\text{Exc/Em}}$ : 545-20 nm / 600-40 nm). Os experimentos foram realizados em placas pretas de 384 poços (Greiner), usando tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100. As reações foram feitas em quadruplicata à 25 °C em um volume de 50  $\mu\text{L}$  por poço. As concentrações finais foram: G6P 400  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NADP}^+$  40  $\mu\text{M}$ , diaforase 1U.mL<sup>-1</sup>, resazurina 10  $\mu\text{M}$  e *TcG6PDH* 1 nM. Controles positivos (100% de atividade) e negativos (0% de atividade) foram feitos sem adição de inibidores e enzima, respectivamente. No cálculo dos valores de  $IC_{50}$  as velocidades de reação obtidas foram normalizadas por controles positivos (100%) e negativos (0%) e ajustadas usando a equação,

$$\%Atividade = 100 / (1 + 10^{(pIC_{50} - p[I]).h}) \quad (2.2)$$

onde, *%Atividade* é a porcentagem de atividade observada nas diferentes concentrações do inibidor, *p[I]* é o logaritmo da concentração do inibidor, *pIC<sub>50</sub>* é o logaritmo do valor de  $IC_{50}$  e *h* é o coeficiente de Hill.

### 2.1.3 - Ensaio Primário Usado na Triagem Biológica Automatizada em Larga Escala

No ensaio primário a reação da *TcG6PDH* foi acoplada com a redução da resazurina a resorufina, catalisada pela enzima diaforase (Figura 2.1). Aproximadamente 30.000 moléculas da coleção DIVERset (ChemBridge) foram testadas a uma concentração final de 20  $\mu\text{M}$ . Os

ensaios foram preparados em microplacas pretas de 384 poços (Greiner), com um volume final de 25  $\mu\text{L}$  por poço, usando a estação automatizada JANUS-MDT (PerkinElmer) equipada com um cabeçote de 384 canais. As reações foram feitas em tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% Triton X-100), transferindo 22  $\mu\text{L}$  do reagente A (0,28 nM *TcG6PDH*, 45,44  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>, 1,14 U/mL diaforase e 11,36  $\mu\text{M}$  resazurina), 0,5  $\mu\text{L}$  das moléculas da biblioteca (solução de DMSO 1 mM) e 2,5  $\mu\text{L}$  de G6P 1,25 mM. Após uma incubação de 3h à temperatura ambiente, a fluorescência ( $\lambda_{\text{Exc/Em}} = 530 \text{ nm} / 615 \text{ nm}$ ) foi medida usando o leitor de placas Envision (PerkinElmer). As colunas 1, 2, 23 e 24 foram reservadas aos controles positivos (100% de atividade) e negativos (0% de atividade), preparados sem inibidor e G6P, respectivamente. A porcentagem de atividade da *TcG6PDH* remanescente na presença de cada composto foi calculada usando a equação:

$$\%AR_i = 100 \times (F_i - \mu_{\text{CN}}) / (\mu_{\text{CP}} - \mu_{\text{CN}}), \quad (2.3)$$

onde,  $\%AR_i$  é a porcentagem de atividade remanescente calculada para a molécula *i* presente na biblioteca,  $F_i$  é a intensidade de fluorescência medida para a amostra *i*,  $\mu_{\text{CN}}$  é a média da intensidade de fluorescência dos controles negativos e  $\mu_{\text{CP}}$  é a média da intensidade de fluorescência dos controles positivos. Moléculas que reduzem a atividade da *TcG6PDH* para 62,5% ou menos no ensaio primário foram considerados candidatos a hit.

O fator  $Z'$  foi usado para avaliar o desempenho do ensaio primário. Deste modo, para cada placa preparada na campanha de HTS da *TcG6PDH* obteve-se o valor do fator  $Z'$  usando a equação:

$$Z' = 1 - (3 \times (\sigma_{\text{CP}} + \sigma_{\text{CN}}) / |\mu_{\text{CP}} - \mu_{\text{CN}}|) \quad (2.4)$$

onde,  $\sigma$  e  $\mu$  são os desvios padrão e as médias dos controles positivos (CP) e negativos (CN), respectivamente.

### 2.1.4 – Confirmação dos Hits por Ensaio Ortogonal

A atividade dos candidatos a hit foram retestados usando um ensaio direto contra a *TcG6PDH*, onde a taxa de produção de NADPH foi acompanhada por medidas de fluorescência em diferentes concentrações das moléculas. Os candidatos a hit foram recuperados das placas da biblioteca e diluídos no tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 7,6,

25 mM NaCl e 0,01% triton X-100). Usando essas soluções, foram feitas 8 diluições seriadas (fator 0,5) de modo que as concentrações finais cobriam a faixa de 60 a 0,47  $\mu\text{M}$ . O ensaio foi preparado em placas pretas de 384 poços (Greiner Bio-One) transferindo 13,3  $\mu\text{L}$  da diluição seriada dos candidatos a hit, 4  $\mu\text{L}$  de um solução da enzima (10 nM *TcG6PDH* e 200  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$ , preparada em tampão de reação) e disparando a reação com 2,7  $\mu\text{L}$  G6P 940  $\mu\text{M}$ . As concentrações finais dos candidatos a hit cobriam a faixa de 40 a 0,31  $\mu\text{M}$ . As pipetagens foram feitas usando a estação automatizada JANUS-MDT equipado com um cabeçote de 384 canais. A fluorescência do NADPH ( $\lambda_{\text{Exc/Em}}$ : 340/485 nm) foi medida usando o leitor ENVISION (Perkin-Elmer). As velocidades iniciais calculadas usando a fase linear da reação foram normalizadas pelos controles positivo e negativo (100 e 0% de atividade, respectivamente) para se obter as porcentagens de inibição em cada concentração das moléculas testadas. As moléculas com atividade confirmada e um perfil de resposta dependente da concentração foram selecionadas para reaquisição.

### 2.1.5 – Caracterização dos Hits e Derivados

A partir dos hits selecionados nos ensaios ortogonais, foram recuperados 100 análogos no site da empresa Chembridge (<http://www.hit2lead.com/>). As 110 moléculas foram adquiridas na forma de pó e dissolvidas em DMSO para se obter soluções estoque a 10 mM. As soluções estoque foram armazenadas em tubos individuais a -20 °C. Usando as soluções estoque, as moléculas foram diluídas em DMSO para se obter soluções 1 mM e distribuídas em placas de 96 poços (placas-filha).

Como o ensaio acoplado da G6PDH (Figura 2.1) seria usado para determinar o  $IC_{50}$  dos hits e derivados, a influência das moléculas adquiridas sobre o sistema de detecção de NADPH (diaforase-resazurina) foi avaliada. As moléculas foram testadas a uma concentração de 20  $\mu\text{M}$ . O JANUS-MDT equipado com um cabeçote de 96 canais foi usado para transferir, em quadruplicada para uma placa preta de 384 poços, 44  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo resazurina 11,36  $\mu\text{M}$  e NADPH 22,72  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{L}$  das moléculas das placas-filha e 5  $\mu\text{L}$  de diaforase 125  $\text{mU}\cdot\text{mL}^{-1}$ . A formação de resorufina foi medida usando o leitor de microplacas ENVISION (PerkinElmer) no modo fluorescência ( $\lambda_{\text{Exc/Em}}$ : 570/590 nm). Controles positivos (100% atividade) e negativos (0% atividade) foram feitos sem a presença de inibidores e diaforase, respectivamente. O tampão de reação continha 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100.

Para selecionar quais dentre as 110 moléculas adquiridas tinham atividade contra a

G6PDH, elas foram testadas a 80  $\mu\text{M}$  contra as enzimas de *T. cruzi* e humanos. Os ensaios foram feitos em placas pretas de 384 poços, acoplando a reação da G6PDH ao sistema diaforase-resazurina. O tampão de reação continha 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100. Para a G6PDH de *T. cruzi*, as reações foram preparadas transferindo 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de substratos (500  $\mu\text{M}$  G6P, 50  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>, 1,25 U.mL<sup>-1</sup> diaforase e 25  $\mu\text{M}$  resazurina), 4  $\mu\text{L}$  das moléculas das placas-filha e 6  $\mu\text{L}$  da TcG6PDH 8,33 nM. No caso da G6PDH humana, os ensaios foram feitos transferindo 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de substratos (156,25  $\mu\text{M}$  G6P, 50  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>, 1,25 U.mL<sup>-1</sup> diaforase e 25  $\mu\text{M}$  resazurina), 4  $\mu\text{L}$  das moléculas das placas-filha e 6  $\mu\text{L}$  da Hs $\Delta$ G6PDH 4,16 nM. As soluções de substratos e das enzimas foram adicionadas aos poços das placas de ensaio usando o dispensador Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific). As moléculas testadas foram transferidas das placas-filha para as placas de ensaio, em quadruplicata, usando a estação de pipetagem Versette (Thermo Fisher Scientific) equipada com um cabeçote de 96 canais. A reação foi monitorada medindo a formação de resorufina com o leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH) no modo fluorescência ( $\lambda_{\text{Exc/Em}}$ : 545-20/600-40 nm). As velocidades calculadas foram normalizadas usando controles positivos (100% atividade) e negativos (0% atividade), obtidos omitindo inibidores e enzima, respectivamente.

### 2.1.6 – Determinação dos Valores de IC<sub>50</sub>

Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados usando o ensaio acoplado G6PDH-diaforase-resazurina, medindo as velocidades de reação a diferentes concentrações dos inibidores. Diluições seriadas das moléculas foram preparadas em placas de 96 poços, usando o solvente DMSO. As concentrações finais das moléculas testadas variaram de 80  $\mu\text{M}$  a 78 nM, exceto 16BrEA que foi testado entre 16  $\mu\text{M}$  a 15,6 nM. A última coluna das placas de diluição seriada foi reservada aos controles positivos e negativos.

As reações foram feitas em placas pretas de 384 poços, usando um tampão de reação contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100. Para a G6PDH de *T. cruzi*, as reações foram preparadas transferindo 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de enzimas (50  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>, TcG6PDH 1,25 nM, 1,25 U.mL<sup>-1</sup> diaforase e 25  $\mu\text{M}$  resazurina), 4  $\mu\text{L}$  das moléculas nas placas de diluição seriada e 6  $\mu\text{L}$  de G6P 3,33 mM. Com a G6PDH humana, os ensaios foram feitos transferindo 40  $\mu\text{L}$  de uma solução de enzimas (50  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>, 0,63 nM Hs $\Delta$ G6PDH, 1,25 U.mL<sup>-1</sup> diaforase e 25  $\mu\text{M}$  resazurina), 4  $\mu\text{L}$  das moléculas nas placas de diluição seriada e 6  $\mu\text{L}$  de G6P 1,04 mM.

As soluções de G6P e das enzimas foram adicionadas aos poços das placas de ensaio usando o dispensador Multidrop Combi (Thermo Fisher Scientific). As moléculas das placas de diluição seriada foram transferidas em quadruplicata para as placas de ensaio usando a estação de pipetagem Versette (Thermo Fisher Scientific), equipada com um cabeçote de 96 canais. A reação foi monitorada medindo a formação de resorufina com o leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH) no modo fluorescência ( $\lambda_{Exc/Em}$ : 545-20/600-40 nm). As velocidades foram normalizadas pelos valores médios dos controles positivos e negativos, preparados sem adição de inibidores (100% atividade) e sem adição de G6P (0% atividade), respectivamente. Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados no software GraphPad Prism por regressão não-linear dos dados com a equação 2.2.

### 2.1.7 – Mecanismo de Inibição

Os mecanismos de inibição das moléculas 7955679, 9126312 e 9068502, escolhidos respectivamente como representantes das classes tienopirimidinas, quinazolinonas e quinazolinonas-piperazina, foram determinados avaliando o efeito das três moléculas sobre os valores de  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$  de G6P e  $NADP^+$ . O efeito de diferentes concentrações dos inibidores sobre o G6P foi avaliado medindo as velocidades iniciais de reação com o substrato entre 2 mM à 15,6  $\mu$ M (fator de diluição 0,5), mantendo a concentração do  $NADP^+$  e da enzima a 200  $\mu$ M e 1 nM, respectivamente. De maneira similar, o efeito de diferentes concentrações dos inibidores sobre o  $NADP^+$  foi avaliado variando as concentrações do cofator entre 200 à 1,56  $\mu$ M (fator de diluição 0,5), mantendo a concentração do G6P e da enzima a 2 mM e 1 nM, respectivamente. A reação foi monitorada medindo a fluorescência do NADPH ( $\lambda_{Exc/Em}$ : 340-20/460-20 nm) com o leitor de microplacas CLARIOstar. As reações foram preparadas em quadruplicata em placas pretas de 96 poços, usando um volume final de 120  $\mu$ L. O tipo de mecanismo de inibição e os valores das constantes de inibição foram determinados através do ajuste não-linear dos dados à equação:

$$v = (V_{max}^{app}/\beta \times [S]) / (K_m^{app}/\beta + [S]), \quad (2.5)$$

onde,  $\beta = 1 + [I]/\alpha K_i$ , com  $[I]$  sendo a concentração do inibidor e  $\alpha K_i$  a constante de inibição. Esta análise foi realizada com o programa GraphPad Prism.

### 2.1.8 – Agrupamentos dos Inibidores por Índice de Similaridade Estrutural

O programa SARANEA<sup>93</sup> foi usado para agrupar as moléculas ativas para a *TcG6PDH*. O arquivo de entrada foi preparado incluindo sequencialmente: representação *SMILE*, identificação, nome, *IC*<sub>50</sub> e descritores moleculares do tipo *MACCS*. Representações *SMILE* e descritores *MACCS* foram gerados usando o programa Open Babel.<sup>94</sup> O agrupamento foi feito usando um índice de similaridade de 0,70, baseado no coeficiente de Tanimoto calculado usando a equação:

$$Sim_{(a,b)} = Nc / (Na + Nb - Nc) \quad (2.6)$$

onde, *Nc* é o número de descritores comuns entre as moléculas *a* e *b*; com *Na* e *Nb* sendo o número de descritores de cada molécula.

## 2.2 – Inibição da G6PDH de *L. mexicana* por Quinazolinonas

### 2.2.1 – Produção e Purificação da *LmG6PDH*

Para produção da *LmG6PDH*, células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com uma construção pET28a\_ *LmG6PDH* descrita anteriormente<sup>73</sup> foram cultivadas em meio de auto indução ZYM-5052 contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina (200 rpm, 20 °C, 48h). As células foram isoladas por centrifugação (10.000 g, 15 minutos, 4 °C) e ressuspendidas em tampão A2 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,3 M NaCl, 10 mM imidazol, 5 mM β-ME) de modo a se obter 0,5 g<sub>pellet</sub>/mL. PMSF (1mM) e lisozima (1 mg/mL) foram adicionados a suspensão de células e após uma incubação de 30 minutos a 4 °C, a amostra foi submetida a 25 ciclos de sonicação com duração de 10 segundos e intervalos de 10 segundos entre cada ciclo (VibraCell VCX-500, Sonics). Após lise, a amostra foi clarificada por centrifugação (18.000 g, 30 minutos, 4 °C) e o sobrenadante submetido a uma cromatografia de afinidade (IMAC) usando uma coluna HisTrap FF de 5mL (GE Healthcare). O tampão B2 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,3 M NaCl, 1 M imidazol, 5 mM β-ME) foi usado para gerar um gradiente crescente de imidazol até a *LmG6PDH* ser eluída da coluna. As frações contendo a proteína de interesse foram combinadas e concentradas a 4 °C (Centricon, 30 kDa, 3.000 g). A amostra obtida por IMAC foi submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em uma coluna HiLoad Superdex

200 16/60 (GE Healthcare), usando tampão GF2 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,3 M NaCl e 5 mM  $\beta$ -ME) como fase móvel. As frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular que continham a *LmG6PDH* foram novamente combinadas e a amostra concentrada até aproximadamente 1,5 mg/mL (Centricon, 30 kDa, 3.000 g).

### 2.2.2 – Ensaios Cinéticos com a *LmG6PDH*

A reação da *LmG6PDH* foi monitorada usando o leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH) para medir a emissão de fluorescência do NADPH ( $\lambda_{Exc/Em}$ : 340 nm / 460 nm). A atividade das enzimas foi medida em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e triton X-100 0,01%. As reações foram feitas em triplicata à 25 °C, usando microplacas pretas de 96 poços (Greiner), em um volume de 120  $\mu$ L.  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$  foram calculados por regressão não-linear dos dados com o programa GraphPad Prism, usando a equação (2.1). Os parâmetros catalíticos da *LmG6PDH* foram obtidos variando a concentração do G6P de 2 mM a 15,63  $\mu$ M e de NADP<sup>+</sup> de 200  $\mu$ M a 1,56  $\mu$ M, enquanto o outro substrato foi mantido a concentrações saturantes de 200  $\mu$ M e 2 mM para o NADP<sup>+</sup> e G6P, respectivamente. A concentração de *LmG6PDH* foi mantida a 1 nM.

### 2.2.3 - Determinação dos Valores de $IC_{50}$

Microplacas de 96 poços foram usadas para fazer 11 diluições seriadas (fator de 0,5) das moléculas usando o solvente DMSO. Essas placas foram usadas para preparar ensaios onde as concentrações finais das moléculas testadas cobririam a faixa de 80  $\mu$ M a 78 nM. A coluna 12 das placas de diluição seriada receberam DMSO para serem usadas no preparado de controles positivos e negativos. Os valores de  $IC_{50}$  foram determinados usando o ensaio acoplado *LmG6PDH*-diaforase-resazurina. As reações foram feitas em placas pretas de 384 poços, usando a estação de pipetagem JANUS-MDT (PerkinElmer) equipada com uma cabeça de 96 ponteiros. Um volume final de 50  $\mu$ L por poço foi obtido transferindo, em quadruplicata, 44  $\mu$ L do mix de reagentes (*LmG6PD* 0,568 nM, NADP<sup>+</sup> 68,2  $\mu$ M, Diaforase 1,14 IU.mL<sup>-1</sup> e resazurina 11,76  $\mu$ M), 1  $\mu$ L das moléculas nas placas de diluição seriada e iniciando a reação com 5  $\mu$ L G6P 1,1 mM. Tanto o mix de reagentes quanto o G6P foram preparados em tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100). A atividade da *LmG6PDH* foi correlacionada com a formação de resorufina medida com o leitor de microplacas CLARIOstar (BMG LABTECH) no modo fluorescência

( $\lambda_{\text{Exc/Em}}$ : 545-20/600-40 nm). As reações foram feitas a 25 °C e as velocidades obtidas nas diferentes concentrações do inibidor foram normalizadas pelos controles positivo e negativo (obtidos omitindo inibidores e G6P, respectivamente). Os valores de  $IC_{50}$  foram calculados no software GraphPad Prism por regressão não-linear dos dados com a equação 2.2.

#### 2.2.4 – Mecanismo de Inibição das Quinazolinonas

O mecanismo de inibição da molécula *9148049*, escolhido como representante da classe das quinazolinonas, foi determinado avaliando o efeito da molécula sobre os valores de  $K_m^{\text{app}}$  e  $V_{\text{max}}^{\text{app}}$  do G6P e também do  $\text{NADP}^+$ . O efeito de diferentes concentrações do inibidor (6,25 a 0,78  $\mu\text{M}$ ) sobre o G6P foi avaliado medindo as velocidades iniciais de reação com o substrato entre 400 à 3,13  $\mu\text{M}$ , mantendo a concentração do  $\text{NADP}^+$  e da enzima a 80  $\mu\text{M}$  e 1 nM, respectivamente. De maneira similar, o efeito de diferentes concentrações do inibidor sobre o  $\text{NADP}^+$  foi avaliado variando as concentrações do cofator entre 80 à 0,63  $\mu\text{M}$ , mantendo a concentração do G6P e da enzima a 400  $\mu\text{M}$  e 1 nM, respectivamente. A reação foi seguida medindo a fluorescência do NADPH ( $\lambda_{\text{Exc/Em}}$ : 360-20/465-20 nm) com o leitor de microplacas CLARIOstar, a uma temperatura de 25 °C. As reações foram preparadas em triplicata em placas pretas de 96 poços, com um volume final de 100  $\mu\text{L}$ , usando tampão 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e 0,01% triton X-100. O tipo de mecanismo de inibição e os valores das constantes de inibição foram determinados através do ajuste não-linear dos dados à equação 2.5. A análise foi feita com o software GraphPad Prism.

### 2.3 – Avaliação do Efeito das Quinazolinonas e Tienopirimidinas sobre a Viabilidade do *Trypanosoma cruzi*

#### 2.3.1 – Cultivo da Forma Epimastigota de *T. cruzi* cepa Y

A forma epimastigota do *T. cruzi* (cepa Y) foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann (Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo) e cultivada a 27 °C em meio LIT pH 7,2 (do inglês, *Liver Infusion Tryptose*) (Tabela 2.1). A cultura de células foi repicada, em condições assépticas, sempre que atingia uma densidade próxima de  $10^7$  parasitos.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 2.1** – Composição do meio LIT pH 7,2 usado para cultivar células epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Reagente	Concentração
NaCl	4,0 g.L <sup>-1</sup>
KCl	0,4 g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 g.L <sup>-1</sup>
Triptose	5,0 g.L <sup>-1</sup>
Infusão de fígado	3,0 g.L <sup>-1</sup>
Dextrose	2,0 g.L <sup>-1</sup>
Soro Fetal Bovino	10 % (v/v)
Hemina	10 mg.L <sup>-1</sup>
Penicilina/Estreptomicina (10.000 UI.mL <sup>-1</sup> /10 mg.mL <sup>-1</sup> )	0,5 %

### 2.3.2 –Ensaio de Viabilidade Celular com a Forma Epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y)

Para avaliar se as quinazolinonas e tienopirimidinas que inibiam a enzima *TcG6PDH* afetavam o crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*, essas moléculas foram inicialmente incubadas com o parasito a uma concentração de 80 µM por um período de 96h. Os ensaios foram preparados em microplacas de 96 poços, transferindo para cada poço 2 µL das moléculas teste à 4 mM (preparadas em DMSO) e 98 µL de meio LIT contendo 1 x 10<sup>5</sup> parasitas.

Após incubação das moléculas testadas com os epimastigotas, o número de células viáveis foi estimado por medida indireta usando o kit comercial CellTiter96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Para isso, 20 µL uma mistura do sal MTS (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxifenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazólio) e do agente acoplador de elétrons PMS (metilsulfato de fenazina) (preparada segundo recomendações do fabricante) foi adicionada aos poços da placa de ensaio e incubada no escuro à uma temperatura de 27°C por 3-4 horas. Nesse período, o MTS foi bioreduzido por células metabolicamente ativas através da ação do PMS levando a formação do produto colorimétrico formazan, que foi quantificado medindo a absorbância à 490 nm com o leitor de microplacas Envision (PerkinElmer). Quando as células morrem ou tem sua atividade metabólica reduzida, perdem a capacidade de reduzir MTS a formazan. Assim, o valor da absorbância a 490 nm foi usado como uma estimativa do número de células viáveis. Os valores de absorbância foram normalizados usando controles positivos (100% de viabilidade) e negativos (0% de viabilidade) que foram preparados com DMSO e Benzonidazol 160 µM, respectivamente.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

As moléculas que mostraram atividade tripanocida à 80 µM foram retestadas, usando a metodologia descrita acima, em concentrações que estavam na faixa de 80 à 1,25 µM. Também foram testadas as moléculas de benzonidazol, epiandrosterona (EA) e 16- $\alpha$ -Bromo-epiandrosterona (16BrEA). Os valores de  $EC_{50}$  foram estimados no programa GraphPad Prism ajustando uma curva sigmoideal semi-logaritmica aos dados de viabilidade celular, usando a equação:

$$\%Viabilidade = 100 / (1 + 10^{((pEC_{50} - p[I]) \times h)}) \quad (2.7)$$

onde  $\%Viabilidade$  é a porcentagem de células viáveis,  $pEC_{50}$  é o logaritmo do valor de  $EC_{50}$ ,  $p[I]$  é o logaritmo da concentração do inibidor e  $h$  é o coeficiente de Hill.

## 2.4 – Estudos Estruturais e Cinéticos da G6PDH Truncada

### 2.4.1 – Desenho das Construções Truncadas

Baseados nas sequências das proteínas G6PDH de *T. cruzi* cepa CL Brener (*TcG6PDH*; XP\_820060.1; 555 aa) e de *L. mexicana* cepa NHOM/B2/84/BEL46 (AAO37825.1; 562 aa) disponíveis na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), uma sequência de nucleotídeos com códons otimizados para expressão heteróloga em bactéria foi desenhada para produzir um fragmento da *TcG6PDH* (*TcΔG6PDH*; Asp58 a Thr545) e da *LmG6PDH* (*LmΔG6PDH*; Ser60 a Gln551). Os genes sintéticos da *TcΔG6PDH* e *LmΔG6PDH*, clonados entre as enzimas *BamHI* e *XhoI* do vetor de expressão pET28a (pET28a\_ *TcΔG6PDH* e pET28a\_ *LmΔG6PDH*, respectivamente), foram adquiridos junto a GenScript (Piscataway, New Jersey).

### 2.4.2 – Clonagem das G6PDHs Truncadas em Vetor de Expressão pET28-TEV

O vetor pET28-TEV é um vetor pET28a modificado, onde a região que codifica a cauda T7 foi removida e os nucleotídeos que codificam para o sítio de reconhecimento da trombina foram alterados para codificar o sítio de reconhecimento da protease do vírus do mosaico do tabaco (TEV; do inglês, *Tobacco Etch Virus*) (Figura 5.2). Assim, a inserção dos

genes das *Lm*ΔG6PDH e *Tc*ΔG6PDH entre os sítios *Bam*HI e *Xho*I do vetor pET28-TEV faz com que a proteína codificada contenha uma cauda adicional de 21 aa, contra 34 aa codificados no vetor pET28a, com o sítio da protease TEV localizado logo após o peptídeo de polihistidinas.



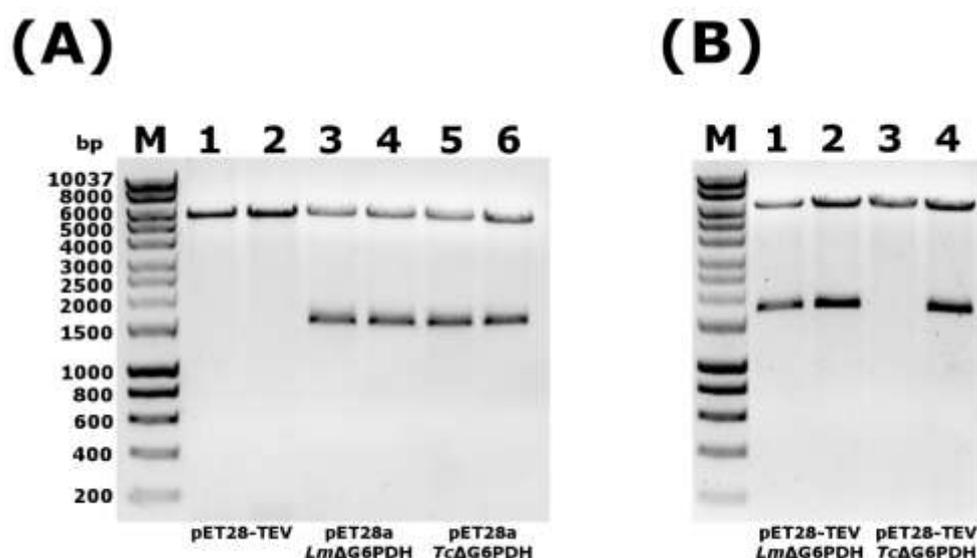
**Figura 2.3** – Mapa do vetor *pET28-TEV*, modificado a partir do vetor pET28a para codificar o sítio de reconhecimento da protease TEV. Os sítios de clonagem estão coloridos de acordo com as enzimas de restrição mostradas acima deles.

O vetor pET28-TEV e as construções pET28a\_*Tc*ΔG6PDH e pET28a\_*Lm*ΔG6PDH foram linearizados por digestão dupla com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I (New England Biolabs), seguindo o protocolo descrito na tabela 2.2. Os produtos da digestão foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1% a 120V por 1h (Figura 2.4-A) e os fragmentos que apresentaram o tamanho esperado (aproximadamente 5.400 bp para pET28-TEV e 1.500 bp para os genes *Tc*ΔG6PDH e *Lm*ΔG6PDH) foram purificados usando o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Os genes *Tc*ΔG6PDH e *Lm*ΔG6PDH purificados foram ligados ao vetor pET28-TEV, visando a obtenção das construções pET28-TEV\_*Tc*ΔG6PDH e pET28-TEV\_*Lm*ΔG6PDH, usando o kit *Clonables* (Novagem). O protocolo usando nas reações de ligação está descrito na tabela 2.3.

**Tabela 2.2** – Protocolo usado na digestão dupla do vetor *pET28-TEV* e das construções *pET28a\_TcΔG6PDH* e *pET28a\_LmΔG6PDH*.

Vetor	pET28-TEV	pET28a	pET28a
Insero	-	<i>TcΔG6PDH</i>	<i>LmΔG6PDH</i>
pDNA	15 µL (124 ng/µL)	7,0 µL (183 ng/µL)	7,0 µL (151 ng/µL)
Buffer 3 (10x)	3,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
BSA (10 mg/mL)	0,3 µL	0,2 µL	0,2 µL
H <sub>2</sub> O estéril	9,7 µL	8,8 µL	8,8 µL
BamHI	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
XhoI	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL

Incubação a 37 °C por 1h.

**Figura 2.4** – Géis de agarose (1%) obtidos na construção do sistema de expressão da *LmΔG6PDH* e *TcΔG6PDH* em *pET28-TEV*. **A)** Colunas 1 e 2, *pET28-TEV* (~5.400 bp); Colunas 3 e 4, *pET28a\_LmΔG6PDH*; Colunas 5 e 6, *pET28a\_TcΔG6PDH*. **B)** DNA plasmidial extraído de dois clones obtidos após reação de ligação da *LmΔG6PDH* (colunas 1 e 2) e *TcΔG6PDH* (colunas 3 e 4) com *pET28-TEV*. Um dos clones (coluna 3) não apresentava o inserto. HyperLadder 1kb (Biolone) usado como marcador molecular (**M**). Conforme descrito na metodologia, todas as amostras foram digeridas com BamHI e XhoI.

**Tabela 2.3** – Protocolo usado nas reações de ligação dos genes *Tc*ΔG6PDH e *Lm*ΔG6PDH aos vetores pET28-TEV.

Etapa	Descrição
1	1,0 μL pET28-TEV 6,7 ng/μL
2	4,0 μL Inseto ( <i>Tc</i> ΔG6PDH 4,0 ng/μL ou <i>Lm</i> ΔG6PDH 2,1 ng/μL)
3	5,0 μL Ligation Premix
4	Incubação a temperatura ambiente (~20 °C) por 15 minutos
5	Usar amostras para transformar células super competentes NOVABlue

O produto da reação de ligação foi usado para transformar bactérias *E. coli* NOVABlue super competentes. Então, dois clones de cada uma das enzimas foram cultivados em 20 mL de meio LB com 30 μg.mL<sup>-1</sup> de canamicina (16h, 37 °C, 250 rpm). O pDNA foi extraído conforme descrito anteriormente e uma fração dessas amostras foi submetida a uma nova digestão dupla com BamHI e XhoI (Tabela 2.4). Após digestão, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a presença do inserto (Figura 2.4-B). A integridade das construções pET28-TEV\_*Tc*ΔG6PDH e pET28-TEV\_*Lm*ΔG6PDH foi verificada por sequenciamento de DNA.

**Tabela 2.4** – Protocolo usado na digestão dupla da construção pET28-TEV\_*Tc*ΔG6PDH.

Construção	pET28-TEV_ <i>Tc</i> ΔG6PDH		pET28-TEV_ <i>Lm</i> ΔG6PDH	
Clone	1	2	1	2
pDNA	7,0 μL (128 ng/μL)	7,0 μL (169 ng/μL)	7,0 μL (122 ng/μL)	7,0 μL (156 ng/μL)
Buffer 4 (10x)	2,0 μL	2,0 μL	2,0 μL	2,0 μL
BSA (10 mg/mL)	0,2 μL	0,2 μL	0,2 μL	0,2 μL
H <sub>2</sub> O estéril	8,8 μL	8,8 μL	8,8 μL	8,8 μL
BamHI	1,0 μL	1,0 μL	1,0 μL	1,0 μL
XhoI	1,0 μL	1,0 μL	1,0 μL	1,0 μL

Incubação a 37 °C por 1h.

### 2.4.3 – Clonagem da *Tc*G6PDH em vetor de expressão pET28-TEV

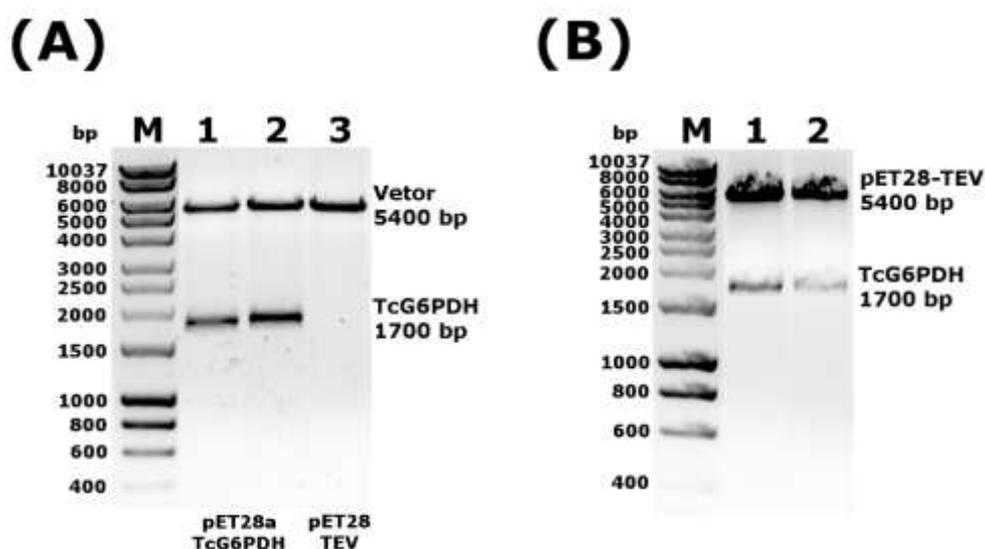
A clonagem do gene da *Tc*G6PDH (Met1 a Ala555) no vetor pET28a (pET28a\_*Tc*G6PDH) foi reportada anteriormente.<sup>90</sup> Assim, pET28a\_*Tc*G6PDH e pET28-TEV foram submetidos a uma digestão dupla com as enzimas de restrição NheI-HF e XhoI (New England Biolabs), seguindo o protocolo descrito na tabela 2.5.

**Tabela 2.5** – Protocolo usado na digestão dupla do vetor pET28-TEV e da construção pET28a\_*TcG6PDH*.

Vetor	pET28-TEV	pET28a_ <i>TcG6PDH</i>
pDNA	11,5 µL (166 ng/µL)	7,0 µL (185 ng/µL)
Buffer 4 (10x)	3,0 µL	2,0 µL
BSA (10 mg/mL)	0,3 µL	0,2 µL
H <sub>2</sub> O estéril	13,2 µL	8,8 µL
<i>NheI</i> -HF	1,0 µL	1,0 µL
<i>XhoI</i>	1,0 µL	1,0 µL

Incubação a 37 °C por 1h.

O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (120V por 1h) (Figura 2.5-A) e os fragmentos que apresentaram o tamanho esperado (1668 bp para *TcG6PDH* e 5.400 bp para pET28-TEV) foram purificados usando o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Para obtenção da construção pET28-TEV\_*TcG6PDH*, foi realizada uma reação de ligação (Tabela 2.6) usando o kit *Clonables* (Novagem).

**Figura 2.5** – Géis de agarose (1%) obtidos na construção do sistema de expressão pET28-TEV\_*TcG6PDH*. **A)** Colunas 1 e 2, pET28a\_*TcG6PDH*; Coluna 3, pET28-TEV. **B)** DNA plasmidial extraído de dois clones obtidos após reação de ligação da *TcG6PDH* com pET28-TEV (colunas 1 e 2). HyperLadder 1kb (Bioline) usado como marcador molecular (M). Conforme descrito na metodologia, todas as amostras foram digeridas com *NheI*-HF e *XhoI*.

**Tabela 2.6** – Protocolo usado na reação de ligação do gene *TcG6PDH* ao vetor pET28-TEV, ambos digeridos com as enzimas de restrição *NheI*-HF e *XhoI*.

Etapa	Descrição
1	1,0 µL pET28-TEV 10 ng/µL
2	4,0 µL <i>Tc</i> ΔG6PDH 3,7 ng/µL
3	5,0 µL Ligation Premix
4	Incubação a temperatura ambiente (~20 °C) por 15 minutos
5	Usar amostras para transformar células super competentes NOVABlue

O produto da reação de ligação foi usado para transformar bactérias *E. coli* NOVABlue super competentes. Dois clones foram cultivados em 20 mL de meio LB com 30 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina (16h, 37 °C, 250 rpm) e o pDNA foi extraído conforme descrito anteriormente. Uma fração dos plasmídeos obtidos foi digerida com *NheI*-HF e *XhoI* (Tabela 2.7) e analisada por eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a presença do inserto (Figura 2.5-B). A integridade da construção pET28-TEV\_*Tc*G6PDH foi verificada por sequenciamento de DNA.

**Tabela 2.7** – Protocolo usado para digestão dupla das construções pET28-TEV\_*Tc*ΔG6PDH e pET28-TEV\_*Lm*ΔG6PDH.

Construção	pET28-TEV_ <i>Tc</i> ΔG6PDH		pET28-TEV_ <i>Lm</i> ΔG6PDH	
	1	2	1	2
Clone				
pDNA	7,0 µL (128 ng/µL)	7,0 µL (169 ng/µL)	7,0 µL (122 ng/µL)	7,0 µL (156 ng/µL)
Buffer 3 (10x)	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL	2,0 µL
BSA (10 mg/mL)	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL
H <sub>2</sub> O estéril	8,8 µL	8,8 µL	8,8 µL	8,8 µL
BamHI	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
XhoI	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL

Incubação a 37 °C por 1h.

#### 2.4.4 – Produção e Purificação da *Tc*ΔG6PDH e *Tc*G6PDH-TEV

Células *E. coli* BL21 (DE3) competentes foram transformadas com pET28-TEV\_*Tc*ΔG6PDH ou pET28-TEV\_*Tc*G6PDH e crescidas em meio de auto indução ZYM-5052<sup>91</sup> contendo 50 µg.mL<sup>-1</sup> de canamicina, com agitação de 200 rpm, à 37 °C por 3h e depois por mais 21h a 20 °C. As células foram isoladas por centrifugação a 3.500 g por 30

minutos a 4 °C e ressuspensas em tampão A3 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 20 mM imidazol, 5% glicerol e 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol). DNase e uma pastilha de inibidores de protease livre de EDTA (ThermoFisher) foram adicionados a suspensão de células antes de realizar a lise com um disruptor de células (Pressure Cell Homogenizer, Stated) usando uma pressão de 20.000 psi. Após lise, a amostra foi clarificada por centrifugação (4 °C, 30 minutos, 40.000 g) e o sobrenadante submetido a uma cromatografia de afinidade (IMAC; do inglês, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) usando uma coluna HisTrap HP (GE Healthcare) de 5mL conectada a um sistema de purificação de proteínas (AKTA Purifier, GE Healthcare). O tampão B3 (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 500 mM imidazol, 5% glicerol e 5 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) foi usado para gerar um gradiente de imidazol, de modo que as proteínas que ligavam inespecificamente à coluna de afinidade eram eluídas com aproximadamente 80 mM imidazol, enquanto a *Tc* $\Delta$ G6PDH ou *Tc*G6PDH-TEV (*Tc*G6PDH contendo sítio de reconhecimento da protease TEV na cauda de histidina) foram eluídas da coluna com aproximadamente 200 mM de imidazol. Na purificação de cada uma das enzimas, as frações contendo a proteína de interesse foram combinadas e a amostra concentrada usando um dispositivo de ultrafiltração (Vivaspin 20, 30 kDa, Sartorius) à 3.000 g em um temperatura de 4 °C. No caso da *Tc* $\Delta$ G6PDH, a amostra obtida por IMAC foi concentrada e submetida a uma cromatografia de exclusão molecular em uma coluna HiLoad Superdex 200 26/60 (GE Healthcare) conectada a um AKTA Purifier, usando tampão GF3 (20 mM Tris-HCl pH 8,0 e 0,2 M NaCl) como fase móvel. As frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular que continham a *Tc* $\Delta$ G6PDH foram novamente combinadas,  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) foi adicionado (concentração final 5 mM) e a amostra foi concentrada.

#### 2.4.5 – Produção e Purificação da *Lm* $\Delta$ G6PDH

A enzima *Lm* $\Delta$ G6PDH foi produzida e purificada usando o mesmo protocolo descrito para a *Tc* $\Delta$ G6PDH (item 2.4.4), exceto que as células de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com pET28-TEV\_*Lm* $\Delta$ G6PDH.

#### 2.3.6 – Ensaios Cinéticos com a *Tc* $\Delta$ G6PDH e *Tc*G6PDH-TEV

A atividade da *Tc* $\Delta$ G6PDH e *Tc*G6PDH-TEV foi medida acompanhando a formação de NADPH na reação direta. A fluorescência do NADPH ( $\lambda_{Exc/Em}$ : 340 nm / 460 nm) foi monitorado usando um leitor de microplacas (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH). A

atividade das enzimas foi medida em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,5M NaCl, 5% glicerol e 2 mM  $\beta$ -ME. As reações foram feitas em triplicata à 25 °C, usando microplacas pretas de 96 poços (Greiner), com um volume final de 120  $\mu$ L por poço. Os valores aparentes para a constante de Michaelis-Menten ( $K_m^{app}$ ) e velocidade máxima de reação ( $V_{max}^{app}$ ) foram calculados por regressão não-linear dos dados, no programa GraphPad Prism, usando a equação (2.1).

Para a *Tc* $\Delta$ G6PDH, o  $K_m^{app}$  para o G6P foi obtido variando a concentração do substrato de 2 mM a 15,6  $\mu$ M, enquanto a concentração de  $NADP^+$  e enzima foram mantidas a 1 mM e 2 nM, respectivamente. Igualmente, o  $K_m^{app}$  do  $NADP^+$  foi obtido variando a concentração de 1 mM a 7,8  $\mu$ M, a uma concentração fixa de 2 mM de G6P.

Os parâmetros catalíticos da *Tc*G6PDH-TEV foram obtidos variando a concentração do G6P de 2 mM a 15,6  $\mu$ M e de  $NADP^+$  de 1 mM a 7,8  $\mu$ M, enquanto o outro substrato foi mantido a concentrações saturantes de 600  $\mu$ M e 2 mM para o  $NADP^+$  e G6P, respectivamente. A concentração de *Tc*G6PDH-TEV foi mantida a 2 nM nestes ensaios.

#### 2.4.7 – Ensaios Cinéticos com a *Lm* $\Delta$ G6PDH

A reação da *Lm* $\Delta$ G6PDH foi monitorada usando o leitor de microplacas FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH) para medir a emissão de fluorescência do NADPH ( $\lambda_{Exc/Em}$ : 340 nm / 460 nm). A atividade das enzimas foi medida em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 25 mM NaCl e triton X-100 0,01%. As reações foram feitas em triplicata à 25 °C, usando microplacas pretas de 96 poços (Greiner), em um volume de 120  $\mu$ L.  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$  foram calculados por regressão não-linear dos dados com o programa GraphPad Prism, usando a equação (2.1). O  $K_m^{app}$  para o G6P foi obtido variando a concentração do substrato de 2 mM a 15,63  $\mu$ M, enquanto a concentração de  $NADP^+$  e enzima foram mantidas a 300  $\mu$ M e 1 nM, respectivamente. Igualmente, o  $K_m^{app}$  do  $NADP^+$  foi obtido variando a concentração entre 300 mM a 2,34  $\mu$ M, a uma concentração fixa de 2 mM de G6P.

#### 2.4.8 – Ensaios de Cristalização da *Tc* $\Delta$ G6PDH e *Lm* $\Delta$ G6PDH

As amostras puras da *Tc* $\Delta$ G6PDH e *Lm* $\Delta$ G6PDH concentradas até aproximadamente 20 mg.mL<sup>-1</sup> foram filtradas (0,1  $\mu$ m Ultrafree-MC centrifugal filter, Millipore) para remover quaisquer agregados e usadas nos ensaios de cristalização. Para triagem inicial das condições de cristalização, utilizou-se o método de difusão de vapor em gota sentada. Os kits comerciais

de triagem utilizados, preparados com base na técnica de matriz esparsa, foram obtidos junto as empresas Qiagen (Classics Suite) e Molecular Dimensions (PGA e JCSG plus). As gotas de cristalização foram preparadas em microplacas de 96 poços usando o sistema automatizado Phoenix/RE (Art Robbins Instruments), transferindo 100 nL da solução da proteína e 100 nL da solução do reservatório. As gotas foram equilibradas contra 50  $\mu$ L do reservatório a 20 °C e fotodocumentadas com o hotel de placas CrystalMation (Rigaku). As condições de triagem feitas para a *Tc* $\Delta$ G6PDH e *Lm* $\Delta$ G6PDH estão descritas na tabela 2.7.

**Tabela 2.8** – Triagens Iniciais de Condições de Cristalização das G6PDHs Truncadas.

<b>Kit de Triagem</b>	<b>Proteína</b>	<b>Ligante</b>	<b>Solução Tampão</b>
Classics Suite	<i>Tc</i> $\Delta$ G6PDH 10 mg.ml <sup>-1</sup>	2 mM NADP <sup>+</sup>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,2 M NaCl
		2 mM G6P	20 mM Tris-HCl pH 8,0
		2 mM NADPH	0,2 M NaCl
	<i>Lm</i> $\Delta$ G6PDH 10 mg.ml <sup>-1</sup>	5 mM G6P	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,2 M NaCl
		5 mM G6P	20 mM Tris-HCl pH 8,0
		2 mM NADPH	0,2 M NaCl
JCSG plus	<i>Tc</i> $\Delta$ G6PDH 10 mg.ml <sup>-1</sup>	2 mM NADP <sup>+</sup>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,2 M NaCl
		2 mM G6P	20 mM Tris-HCl pH 8,0
		2 mM NADPH	0,2 M NaCl
	<i>Lm</i> $\Delta$ G6PDH 10 mg.ml <sup>-1</sup>	5 mM G6P	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,2 M NaCl
		5 mM G6P	20 mM Tris-HCl pH 8,0
		2 mM NADPH	0,2 M NaCl
PGA	<i>Lm</i> $\Delta$ G6PDH 10 mg.ml <sup>-1</sup>	5 mM G6P	20 mM Tris-HCl pH 8,0 0,2 M NaCl

Cristais da *Tc* $\Delta$ G6PDH obtidos na condição G1 do kit JCSG-plus da Molecular Dimensions (30 % jeffamina ED-2003, 0,1 M HEPES pH 7,0) foram reproduzidos usando a técnica de difusão de vapor em gota suspensa, preparados manualmente em placas Linbro de 24 poços (Hampton Research), misturando 1  $\mu$ L da proteína (10 mg.ml<sup>-1</sup> *Tc* $\Delta$ G6PDH, 2 mM de G6P, 2mM NADPH, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 M NaCl, 5 mM  $\beta$ -ME) com 1 $\mu$ L da solução do reservatório (30 % jeffamina ED-2003, 0,1 M HEPES pH 7,0). Essas gotas foram

equilibradas a 18 °C contra 500 µL do reservatório. A otimização da condição inicial foi feita usando a técnica de gota suspensa descrita. Cristais apropriados para experimentos de difração de raios-X foram obtidos quando 2 µL da solução de proteína (10 mg.ml<sup>-1</sup> *Tc*ΔG6PDH, 5 mM de G6P, 2 mM NADPH, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 M NaCl, 5 mM β-ME) foi misturado com 1 µL da solução do reservatório (27-32 % de jeffamina ED-2003, 0,1 M HEPES pH 6,8-7,2).

#### 2.4.9 – Coleta dos Dados, Processamento e Determinação da Estrutura da *Tc*ΔG6PDH

Os cristais da *Tc*ΔG6PDH foram colhidos usando um loop de nylon, banhados em solução crioprotetora (45 % jeffamina ED-2003, 0,1 M HEPES pH 6,8) e resfriados usando nitrogênio líquido. Os cristais foram inicialmente testados a uma temperatura de -170 °C em um difratômetro de raios-X (Rigaku MicroMax-007 HF) disponível na Universidade de Dundee (*School of Life Sciences, Univ. of Dundee*), equipado com um de ânodo rotatório, detector do tipo CCD (Saturn 944 HG+) e braço robótico para transferir os cristais para o goniômetro. Os cristais que difrataram a uma resolução igual ou superior a 4 Å *in-house*, foram enviados para coleta de dados na linha I04-1 da fonte de luz síncrotron Diamond (Didcot, UK). A coleta dos dados de difração foi feita usando o método de rotação-oscilação, onde os cristais eram rotacionados no eixo perpendicular ao feixe de raios-X ( $\varphi$ ) em pequenos passos de oscilação.

Os dados de difração foram indexados e integrados usando o programa XDS,<sup>95</sup> para então serem escalonados usando o programa AIMLESS.<sup>96</sup> A estrutura foi resolvida por substituição molecular com o PHASER<sup>97</sup> usando a cadeia A do PDB 4E9I (*Tc*G6PDH-S, 100% de identidade) como modelo de busca. O programa COOT<sup>98</sup> foi usado para manipulação do modelo e incorporação de ligantes e solventes. O refinamento foi feito com o software REFMAC,<sup>99</sup> usando tensor TLS (do inglês, *Translation, Libration and Screw*) e restrição por simetria não cristalográfica (NCS; do inglês, *Non-Crystallographic Symmetry*). Em combinação com as ferramentas oferecidas pelo COOT, a geometria do modelo foi inspecionada usando o MOLPROBITY.<sup>100</sup>

Figuras moleculares foram preparadas usando o PyMOL v.1.8 (Schrödinger, LLC). Quando necessário, a superfície de potencial eletrostático foi calculada usando com os programas PDB2PQR<sup>101</sup> e APBS<sup>102</sup>. O alinhamento das sequências das G6PDHs foi feito usando Clustal Omega<sup>103</sup> Identificação de cavidades e cálculos de seus volumes foram feito usando o software KVFinder.<sup>104</sup> A área acessível a superfície de átomos que compõe um

---

modelo de alta resolução de uma proteína foi calculado com o software AREAIMOL<sup>105</sup>. Os programas disponíveis no pacote de programas CCP4<sup>106</sup> (Collaborative Computational Project Number 4) foram acessados usando a interface gráfica CCP4i.

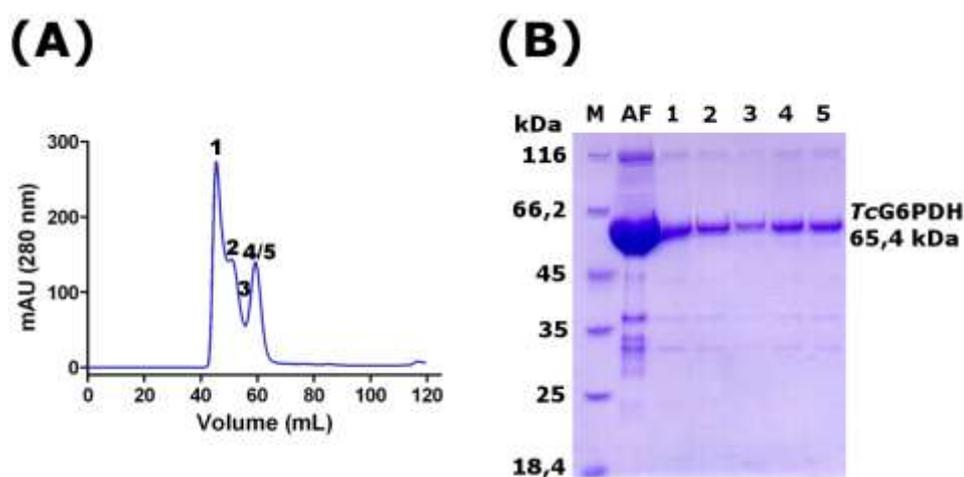
# Capítulo 3

*Produção, Caracterização Cinética e  
Identificação de Inibidores  
da Enzima G6PDH de T. cruzi*

### 3 – Identificação de Inibidores da G6PDH de *T. cruzi*

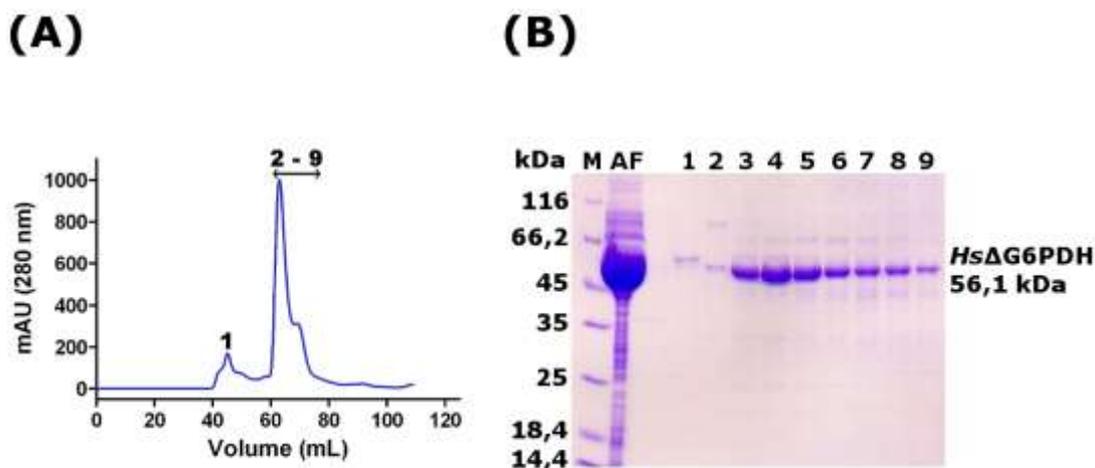
#### 3.1 – Produção e Purificação da G6PDH de *T. cruzi* e humana usadas na Identificação e Caracterização de Novos Inibidores

A TcG6PDH é rotineiramente produzida em nosso laboratório e conforme descrito na seção 2.1.1 recuperada da fração solúvel do lisado bacteriano através de uma cromatografia de afinidade. Antes de ser utilizada nos ensaios enzimáticos, a amostra obtida na cromatografia de afinidade era submetida uma etapa de polimento usando cromatografia de exclusão molecular (Figura 3.1-A). A análise por SDS-PAGE das amostras obtidas na cromatografia de exclusão molecular (Figura 3.1-B) mostra que a TcG6PDH eluia em diferentes estados oligoméricos. Esse comportamento pode ser explicado pela existência de dois resíduos de cisteína presentes na região N-terminal, que poderiam formar pontes dissulfeto levando a formação de agregados proteicos. A presença de um pico de proteína que eluí próximo do volume morto da coluna (Figura 3.1 - fração 1) indica a formação de agregados de alto peso molecular. Sendo assim, somente as amostras coletadas em um volume próximo a 60 mL (Figura 3.1 – frações 4 e 5) eram mantidas para os ensaios subsequentes. A quantidade e pureza destas frações eram suficientes para realização de uma campanha de HTS e caracterização de inibidores.



**Figura 3.1** – Purificação da TcG6PDH. **A)** Cromatograma obtido na cromatografia de exclusão molecular. Frações indicadas por números foram analisadas por SDS-PAGE. **B)** Análise por SDS-PAGE das amostras obtidas durante purificação da TcG6PDH. Amostra na coluna AF foi obtida na cromatografia de afinidade, sendo que as amostras nas colunas 1 a 5 foram obtidas na cromatografia de exclusão molecular. Coluna M, marcador de massa molecular. Gel de poliacrilamida 12% revelado pelo método de Coomassie.

A enzima *Hs*ΔG6PDH foi purificada usando cromatografias de afinidade e exclusão molecular. No caso da enzima humana, quantidades substanciais da enzima eram obtidas usando a metodologia descrita no Capítulo 2, item 2.1.1. No cromatograma da gel filtração era possível notar tres picos distintos, contendo volumes de eluição de aproximadamente 45, 65 e 70 mL (Figura 3.2-A). A análise por SDS-PAGE das amostras correspondentes a esses picos mostrava que a G6PDH humana eluia entre 60 e 75 mL (Figura 3.2-B; frações 2 a 9). A separação da *Hs*ΔG6PDH em dois picos esta de acordo com o esperado para esta proteína. Estudos com a G6PDH humana mostraram que a enzima pode se apresentar como dímero ou tetrâmero, sendo que fatores como pH e força iônica podem afetar o equilíbrio entre essas populações.<sup>107</sup> A caracterização bioquímica da *Hs*ΔG6PDH mostrou que  $K_m^{app}$  para o G6P e  $NADP^+$  são iguais a  $58,3 \pm 0,7 \mu M$  e  $7,5 \pm 0,8 \mu M$ , respectivamente.<sup>92</sup>



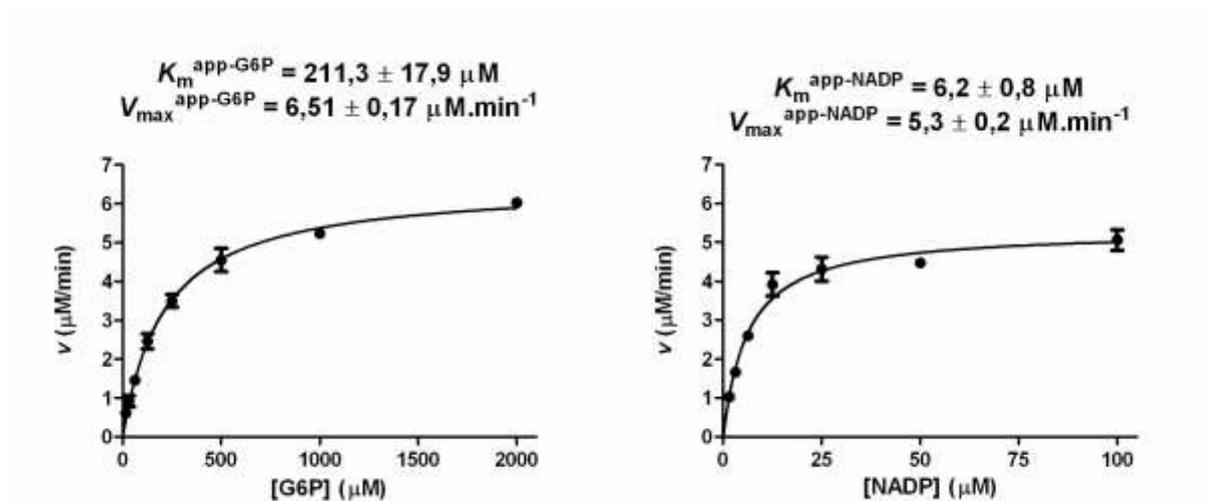
**Figura 3.2** – Purificação da *Hs*ΔG6PDH usada na caracterização dos novos inibidores da G6PDH. **A)** Cromatograma mostrando o perfil de eluição das proteínas durante a cromatografia de exclusão molecular. Frações indicadas por números foram analisadas por SDS-PAGE. **B)** Análise por SDS-PAGE das amostras obtidas durante purificação da *Hs*ΔG6PDH. Amostras na coluna AF foi obtida na cromatografia de afinidade, sendo que as amostras nas colunas 1 a 9 foram obtidas na cromatografia de exclusão molecular. Coluna M, marcador de massa molecular. Gel de poliacrilamida 12% revelado pelo método de Coomassie.

### 3.2 – Avaliação da Atividade da *Tc*G6PDH

Uma das principais fontes de falsos positivos nas fases iniciais de desenvolvimento de fármacos são pequenas moléculas orgânicas que atuam por um mecanismo de agregação

promíscuo.<sup>108,109</sup> Os trabalhos que descrevem o efeito de moléculas agregadoras sobre diferentes enzimas mostram que é possível prevenir e/ou reverter esse tipo de inibição inespecífica pela adição do detergente triton X-100 no tampão de ensaio.<sup>108,109</sup>

Afim de avaliar se o detergente triton X-100 teria algum efeito sobre a atividade da TcG6PDH, determinamos o  $K_m^{app}$  do G6P e  $NADP^+$  na presença deste detergente (Figura 3.3). A afinidade da TcG6PDH pelo G6P e  $NADP^+$  não foi afetada pela presença de triton X-100, estando de acordo com os valores reportados anteriormente.<sup>90</sup>

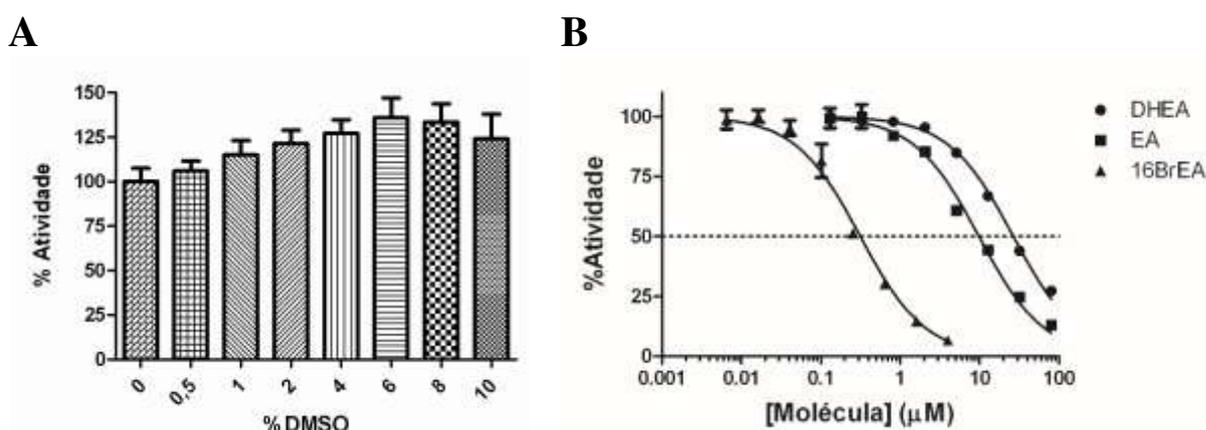


**Figura 3.3** - Gráficos de Michaelis-Menten para G6P e  $NADP^+$  obtidos com a enzima TcG6PDH. Os valores de  $K_m^{app}$  e  $V_{max}^{app}$  obtidos na presença de triton X-100 estão de acordo com os dados publicados para a enzima.<sup>90</sup>

Bibliotecas de pequenas moléculas comumente utilizadas em ensaios de HTS costumam ter uma alta ocorrência de moléculas orgânicas que absorvem luz e/ou florescem na região do espectro usada para detecção do NAD(P)H ( $\lambda_{Exc} = 340 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{Emi} = 460 \text{ nm}$ ).<sup>7</sup> Por este motivo, ensaios baseados na detecção do NAD(P)H podem levar a identificação de um grande número de falsos positivos e/ou negativos. Um fato interessante é que raramente pequenas moléculas orgânicas absorvem luz e/ou fluorescem em uma região do espectro vermelho (550-750 nm). Por este motivo, nos ensaios de triagem de inibidores com a TcG6PDH a formação de NADPH foi acoplada ao sistema diaforase-resazurina,<sup>110</sup> de modo que poderíamos monitorar a reação enzimática medindo a formação do fluoróforo resorufina (Figura 2.1). Este ensaio acoplado vem sendo empregado com sucesso na identificação de inibidores de enzimas produtoras de NAD(P)H.<sup>62,63,89,110</sup>

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente amplamente empregado na diluição de moléculas orgânicas presentes em bibliotecas usadas nos ensaios de HTS. Deste modo,

decidimos avaliar qual seria a máxima concentração de DMSO que poderia ser usada na reação acoplada da *TcG6PDH* (figura 3.4-A). Nesses experimentos observamos que concentrações de até 8-10% de DMSO eram bem toleradas. Essa foi um interessante observação pois, a presença de DMSO o ensaio enzimático pode favorecer a solubilização de moléculas lipofílicas. Além disso, notamos que em ensaios de inibição da *TcG6PDH* usando o sistema diaforase-resazurina com 8% de DMSO, os valores de  $IC_{50}$  obtidos para o DHEA, EA e 16BrEA estão de acordo com o esperado para esses esteroides (Figura 3.4-B).<sup>74</sup>

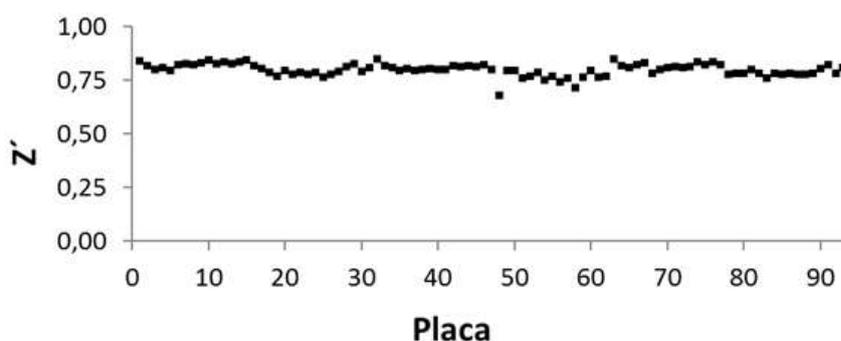


**Figura 3.4** – Ensaio com a *TcG6PDH* usando o sistema acoplado diaforase-resorufina. **A)** Experimentos com diferentes concentrações de DMSO mostrando que concentrações de até 8-10% do solvente são bem toleradas. **B)** Curvas concentração-resposta obtidas em ensaios de inibição com os derivados de esteroides. Os valores de  $IC_{50}$  estimados para o DHEA, EA e 16BrEA são de 26,7  $\mu\text{M}$  (23,7 a 30,0  $\mu\text{M}$ ), 9,8  $\mu\text{M}$  (8,7 a 11,0  $\mu\text{M}$ ) e 0,31  $\mu\text{M}$  (0,28 a 0,35  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. Os valores em parênteses correspondem aos limites estimados usando um intervalo de confiança de 95%.

### 3.3 – Ensaio Primário de Triagem Biológica Automatizada em Larga Escala

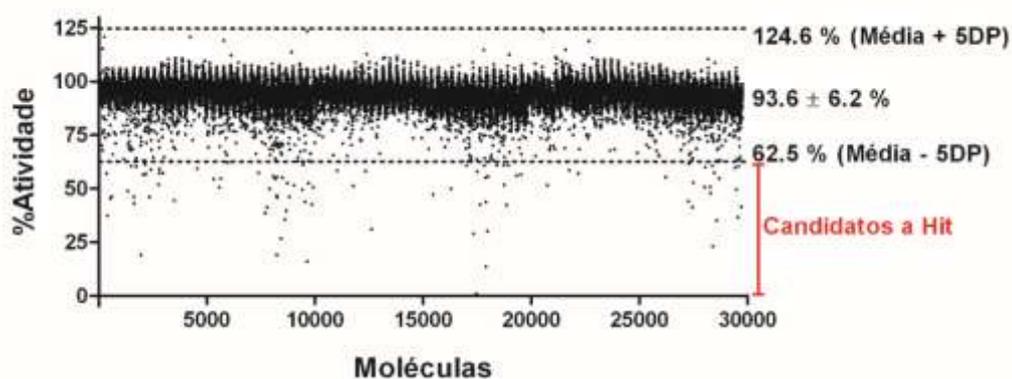
No ensaio de HTS primário da *TcG6PDH* uma coleção de aproximadamente 30.000 moléculas orgânicas com ampla diversidade química (DIVERSet, ChemBridge) foi triada a uma concentração de 20  $\mu\text{M}$  usando o ensaio acoplado com a enzima diaforase (Figura 2.1). O fator  $Z'$  é um parâmetro estatístico amplamente usado para monitorar a qualidade de ensaios de HTS, podendo refletir tanto a faixa dinâmica de sinal do ensaio quanto a variação dos dados associadas com medidas deste sinal (Equação 2.4).<sup>111,112</sup> Além de poder ser usado validação de ensaios, pode também ser empregado no controle de qualidade de cada placa de ensaio preparada durante uma campanha de HTS. Como pode ser observado na figura 3.5,

todas as placas apresentaram um valor de  $Z'$  acima de 0,5, o que implica em uma grande janela de separação entre os sinais medidos para os controles positivos e negativos. A média do fator  $Z'$  calculado sobre as 93 placas preparadas na campanha de HTS foi de  $0,80 \pm 0,03$ .



**Figura 3.5** – Fator  $Z'$  calculado para todas as placas da campanha de HTS da *TcG6PDH* usando a biblioteca DIVERSet (ChemBridge).

A fluorescência medida em cada ensaio do HTS primário foi normalizada usando os controles positivos e negativos presentes nas respectivas placas de ensaio, de modo que a porcentagem de atividade fosse obtida para todas as moléculas testadas (Figura 3.6). A média da atividade calculada sobre todas as moléculas da biblioteca DIVERSet foi de  $93,6 \pm 6,2 \%$ . Um total de 96 moléculas reduziram a atividade da *TcG6PDH* para menos de 62,5%, equivalente à média da atividade normalizada menos cinco vezes o desvio padrão, sendo assim consideradas candidatas a hits.



**Figura 3.6** – Resultado da campanha de HTS da *TcG6PDH*. A porcentagem de atividade remanescente da enzima contra cada molécula da biblioteca DiverSet (Chembridge) foi calculada usando os controles positivos e negativos de cada placa. Todas as moléculas foram testadas a uma concentração de  $20 \mu\text{M}$ . Noventa e seis moléculas reduziram a atividade da *TcG6PDH* para menos de 62,5%, sendo consideradas candidatas a hit.

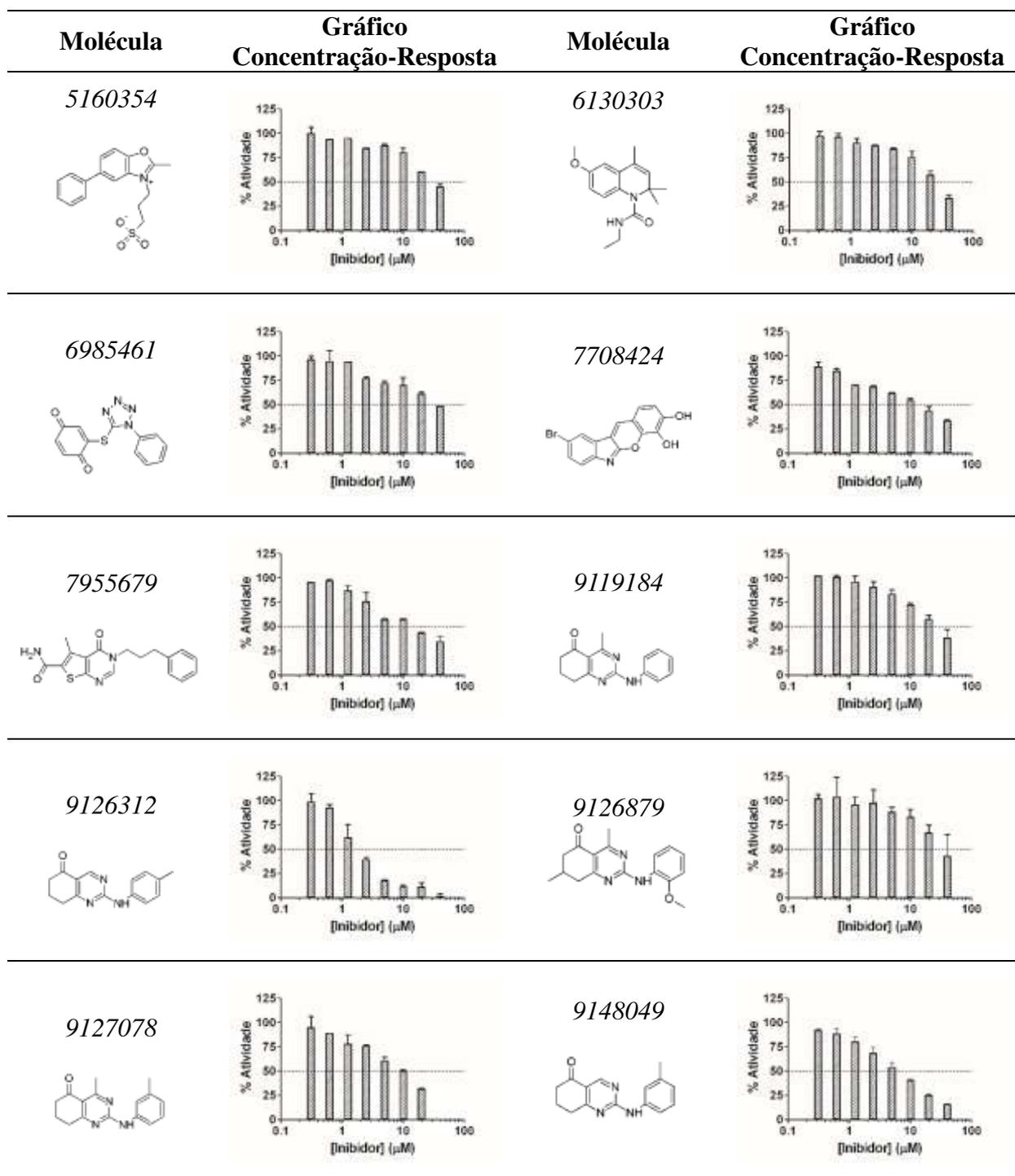
### 3.4 – Confirmação dos Hits por Ensaio Ortogonal

As 96 moléculas consideradas candidatas a hit foram recuperadas das placas da coleção de moléculas e retestadas contra a *Tc*G6PDH usando um ensaio direto, onde a produção de NADPH é acompanhada por medidas de fluorescência. Nesse ensaio confirmatório as moléculas foram diluídas serialmente em tampão de reação, de modo que pudessem ser testadas em uma faixa de concentração de 40,0 a 0,3  $\mu$ M. Apenas 22 das 96 moléculas retestadas mostraram alguma atividade no ensaio direto, entretanto apenas 10 moléculas que mostraram uma relação entre a concentração e a resposta foram selecionadas para os estudos subsequentes (Figura 3.7). Uma possível explicação para o número relativamente baixo de moléculas com atividade confirmada pode estar relacionada a limitações impostas pela metodologia usada nos ensaios ortogonais. Nestes ensaios, a reação enzimática foi monitorada medindo a formação de NADPH, uma molécula que fluoresce em um comprimento de onda ( $\lambda_{Exc/Em}$ : 340/460 nm) que é suscetível a interferências na detecção por outras moléculas orgânicas.

### 3.5 – Caracterização dos Hits e Derivados

A partir dos 10 hits selecionados nos ensaios ortogonais, foram recuperados 100 análogos no site da empresa Chembridge (<http://www.hit2lead.com/>). Essas moléculas podem ser agrupadas em 7 classes químicas, com a seguinte distribuição: 80 quinazolinonas, 15 quinolinas, 7 tienopirimidinas, 3 quinazolininas, 1 benzoquinona, 1 cromenoindol, 1 benzoxazol, 1 indolinona e 1 benzosulfonamida. As 110 moléculas foram adquiridas na forma de pó e soluções estoques foram preparadas usando o solvente DMSO.

Para determinar quais das 110 moléculas inibiam a *Tc*G6PDH resolvemos usar o ensaio acoplado com a diaforase. A escolha pelo ensaio acoplado foi baseada na possibilidade de se eliminar falsos positivos usando um contra ensaio simples, onde se descarta as moléculas que apresentarem atividade contra a diaforase. Como mencionado anteriormente, ensaios bioquímicos usados para avaliar a atividade de substâncias químicas estão sujeitos a interferências que podem levar interpretações equivocadas dos resultados.<sup>108,109,113</sup> Quando a interferência de uma molécula orgânica é reprodutível e dependente da concentração, se torna especialmente difícil diferenciar se a atividade da molécula orgânica é contra o alvo biológico estudado ou resultado de interferências.<sup>113</sup>

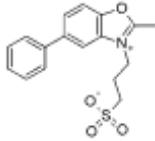
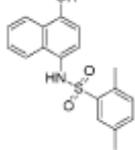
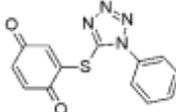
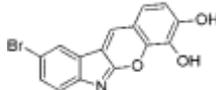


**Figura 3.7** – Moléculas consideradas hits e resultados dos ensaios ortogonais. As 10 moléculas representadas foram selecionadas para os estudos subsequentes por apresentarem um efeito dependente da concentração. Conforme será mostrada a seguir, as moléculas 5160354, 6130303, 6985461 e 7708424 acabaram sendo caracterizadas como falsos positivos.

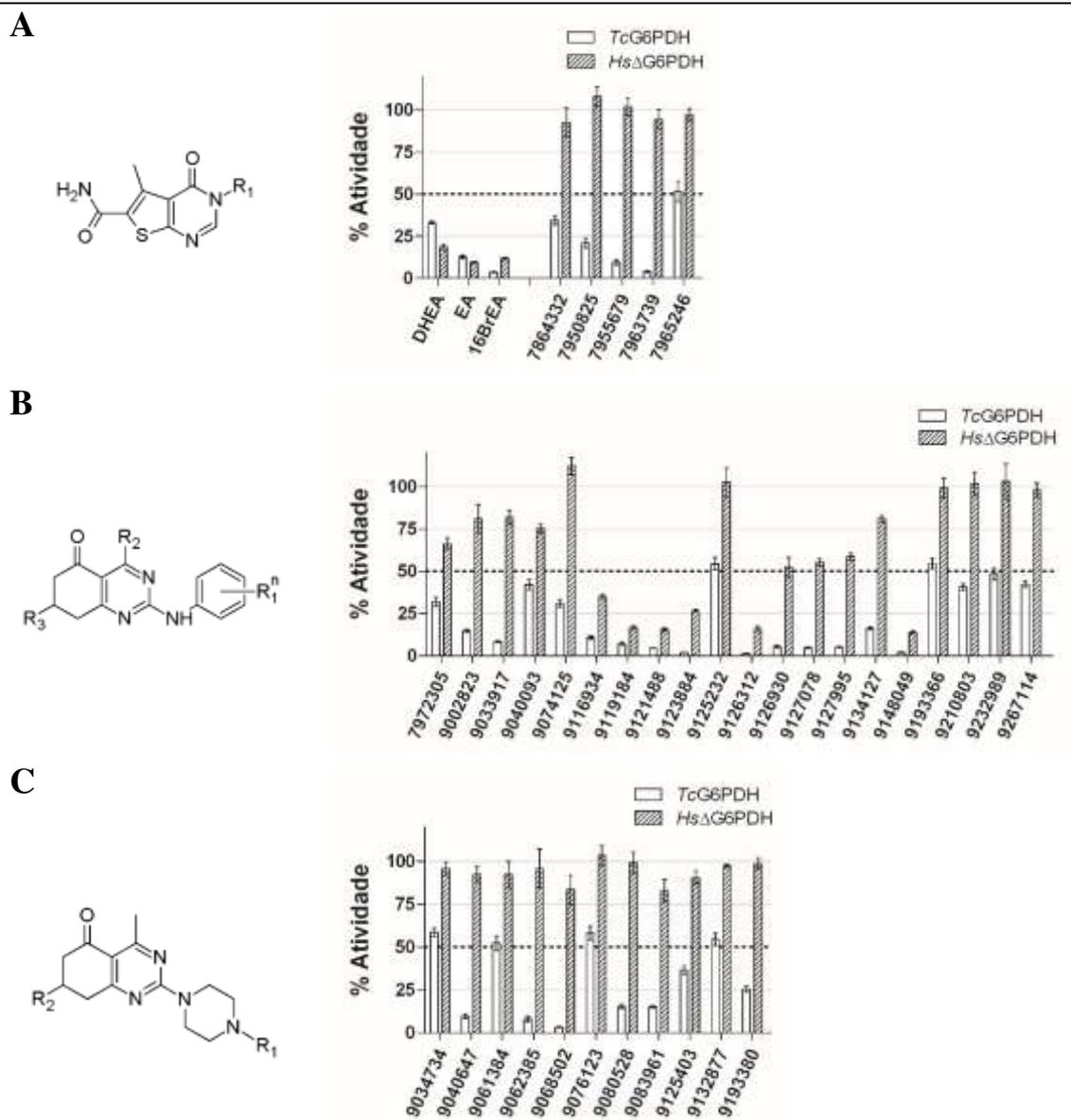
As principais fontes de interferência estão relacionadas a: 1) inibição inespecífica, causada por moléculas altamente reativas ou que inibem outras enzimas usadas nos ensaios que não são o alvo biológico; 2) agregação promíscua, causada por moléculas que formam agregados que sequestram o alvo em sua superfície inativando a enzima; e 3) interferências na tecnologia de detecção, causada por moléculas que, por exemplo, absorvem luz ou apresentam fluorescência no comprimento de onda usado para detecção do sinal.

Dentre as moléculas adquiridas junto a ChemBridge, 4 inibiram a diaforase em 30% ou mais a 20  $\mu$ M (Tabela 3.1) e foram excluídas dos ensaios de caracterização. As 106 moléculas restantes foram inicialmente testadas contra as G6PDH de *T. cruzi* e humanos a 80  $\mu$ M. Trinta e seis moléculas foram capazes de inibir a *Tc*G6PDH em 40% ou mais, sendo que 14 delas também apresentaram algum efeito inibitório contra a *Hs* $\Delta$ G6PDH (Figura 3.8). Dentre as moléculas com atividade contra a *Tc*G6PDH, 5 pertencem à classe das tienopirimidinas (Figura 3.8-A) e 31 das quinazolinonas, subdivididas em dois subgrupos onde um contem derivados de anilina conectados C2 da quinazolinona (Figura 3.8-B) e outro contendo uma piperazina ligada ao C2 (Figura 3.8-C). A molécula 6130303 (Figura 3.7) e seus derivados não tiveram atividade confirmada.

**Tabela 3.1** – Moléculas excluídas da lista de hits da *Tc*G6PDH por apresentarem atividade contra a enzima diaforase.

Códigos	5160354	6138697	6985461	7708424
Estruturas				
AR20 <sup>a</sup>	31,3 $\pm$ 1,3 %	62,0 $\pm$ 1,6 %	70,0 $\pm$ 1,4 %	54,1 $\pm$ 1,9 %

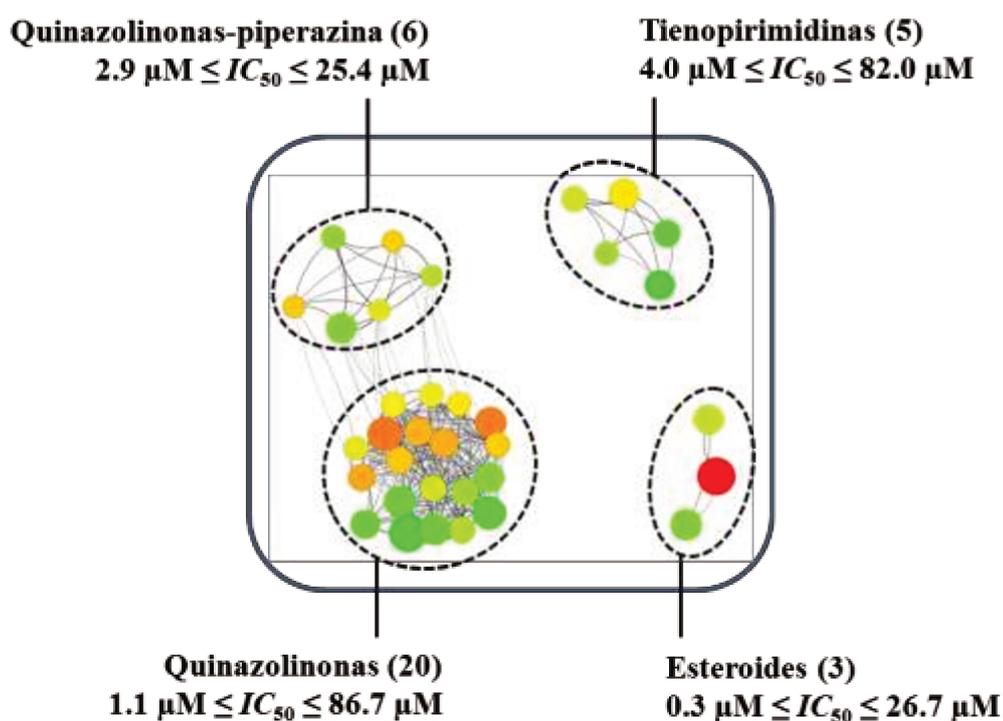
<sup>a</sup> – Atividade enzimática remanescente obtida na presença de 20  $\mu$ M da molécula testada. Valores apresentados representam média e desvio padrão.



**Figura 3.8** – Efeito dos derivados de tienopirimidinas e esteroides (A), quinazolinonas (B) e quinazolinonas-piperazina (C) sobre as G6PDH de *T. cruzi* e humanos. DHEA, EA e 16BrEA (estruturas na figura 18, pág. 40) foram incluídas para ilustrar a falta de seletividade dos esteroides, reduzindo a atividade de ambas as enzimas. As estruturas das outras moléculas estão apresentadas nas tabelas 3.2, 3.3 e 3.4.

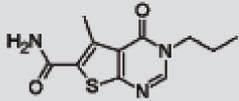
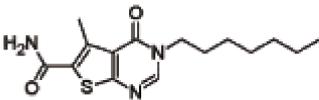
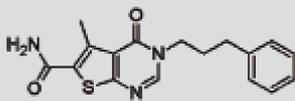
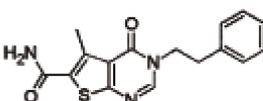
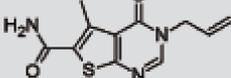
As moléculas que a 80  $\mu\text{M}$  reduziram a atividade da G6PDH de *T. cruzi* e/ou humanos para menos de 60% foram usadas em ensaios de concentração-resposta para determinar os valores de  $IC_{50}$ . Nestes experimentos foi possível determinar os valores de  $IC_{50}$  para 31 novos inibidores da TcG6PDH, que cobriam uma faixa de 1,1 a 86,7  $\mu\text{M}$ . Usando o software SARANEA,<sup>93</sup> os novos inibidores foram separados de acordo com sua similaridade estrutural em 3 grupos: tienopirimidinas, quinazolinonas e quinazolinonas-piperazina (Figura 3.9). O

grupo das tienopirimidinas contem 5 moléculas ativas, com valores de  $IC_{50}$  entre 4,0 e 82,0  $\mu\text{M}$  (Tabela 3.2). O grupo das quinazolinonas contem 20 inibidores com valores de  $IC_{50}$  na faixa de 1,1 a 86,7  $\mu\text{M}$  (Tabela 3.3). Finalmente, o grupo com quinazolinonas-piperazina possui 6 moléculas ativas com valores de  $IC_{50}$  entre 2,9 e 25,4  $\mu\text{M}$  (Tabela 3.4).



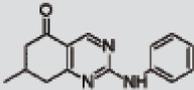
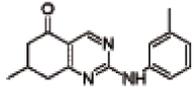
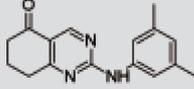
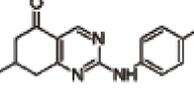
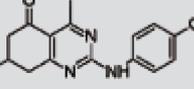
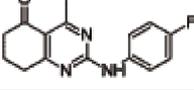
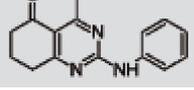
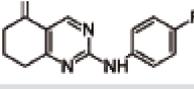
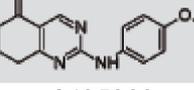
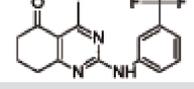
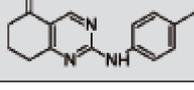
**Figura 3.9** – Agrupamento dos inibidores da *TcG6PDH* por similaridade estrutural. Além do grupo formado por esteroides previamente descritos (DHEA, EA, e 16BrEA), três novos grupo são observados, um contendo 20 quinazolinonas e outros dois menores com 6 derivados de quinazolinonas-piperazinas e 5 derivados de tienopirimidinas. Cada molécula é representada por uma esfera, colorida de vermelho (mais potente) a verde (menos potentes). Os valores de  $IC_{50}$  estão reportados na tabela 3.2 (tienopirimidinas), 3.3 (quinazolinonas), 3.4 (quinazolinonas-piperazinas) e 3.5 (esteroides). A relação entre a estrutura e atividade destes inibidores será discutida no item 3.8. O agrupamento foi feito usando um índice de similaridade de 0,7, baseado no coeficiente de Tanimoto.

**Tabela 3.2** - Atividade das tienopirimidinas sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (TcG6PDH) e humana (HsΔG6PDH).

Código/Estrutura	TcG6PDH		HsΔG6PDH
	AR80 <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (IC95) <sup>c</sup>	AR80 <sup>a</sup>
<p>7864332</p> 	34,5 ± 2,7 %	49,8 μM (45,3 – 54,7)	92,6 ± 8,6 %
<p>7950825</p> 	21,0 ± 2,8 %	15,8 μM (14,5 – 17,3)	108,1 ± 6,0 %
<p>7955679</p> 	9,3 ± 1,6 %	8,7 μM (8,3 – 9,1)	102,0 ± 5,3 %
<p>7963739</p> 	4,0 ± 0,6 %	4,0 μM (3,8 – 4,1)	94,4 ± 5,7 %
<p>7965246</p> 	51,5 ± 6,1 %	82,0 μM (73,6 – 91,3)	97,1 ± 3,6 %

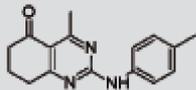
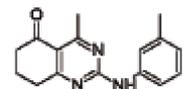
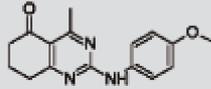
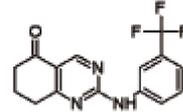
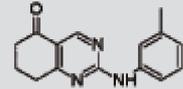
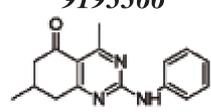
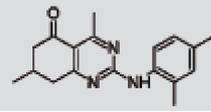
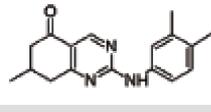
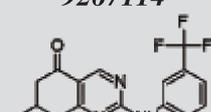
<sup>a</sup> AR80, atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80 μM da molécula testada. Valores apresentados representam média e desvio padrão; <sup>b</sup> IC<sub>50</sub>, concentração do inibidor que reduzir a velocidade de reação em 50%; <sup>c</sup> IC95, intervalo de confiança de 95%;

**Tabela 3.3** - Atividade das quinazolinonas sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (*TcG6PDH*) e humana (*HsΔG6PDH*).

Código/Estrutura	<i>TcG6PDH</i>		<i>HsΔG6PDH</i>		<i>I.S.</i> <sup>d</sup>
	<i>AR80</i> <sup>a</sup>	<i>IC</i> <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( <i>IC95</i> ) <sup>c</sup>	<i>AR80</i> <sup>a</sup>	<i>IC</i> <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( <i>IC95</i> ) <sup>c</sup>	
7972305 	32,0 ± 2,6 %	24,4 μM (22,2 – 26,9)	66,1 ± 3,4 %	74,8 μM (70,2 – 79,7)	3,1
9002823 	14,7 ± 0,9 %	13,1 μM (12,1 – 14,3)	81,0 ± 8,3 %	-	-
9033917 	8,4 ± 0,4 %	8,5 μM (7,8 – 9,2)	81,8 ± 4,2 %	-	-
9040093 	42,1 ± 3,1 %	37,2 μM (34,0 – 40,8)	75,2 ± 2,5 %	-	-
9074125 	31,1 ± 2,1 %	39,5 μM (36,1 – 43,3)	112,1 ± 5,1 %	-	-
9116934 	10,8 ± 1,0 %	5,8 μM (5,3 – 6,3)	35,1 ± 1,4 %	22,6 μM (21,5 – 23,9)	3,9
9119184 	7,1 ± 0,8 %	4,8 μM (4,4 – 5,3)	16,7 ± 0,9 %	9,2 μM (8,7 – 9,7)	1,9
9121488 	4,6 ± 0,1 %	3,0 μM (2,8 – 3,3)	15,5 ± 0,9 %	8,5 μM (8,0 – 8,9)	2,8
9123884 	2,0 ± 0,1 %	2,0 μM (1,8 – 2,2)	26,6 ± 0,8 %	19,3 μM (18,3 – 20,3)	9,7
9125232 	54,4 ± 3,7 %	4,0 μM (3,6 – 4,5)	102,5 ± 8,5 %	-	- <sup>c</sup>
9126312 	1,4 ± 0,1 %	1,1 μM (1,0 – 1,1)	15,9 ± 1,7 %	8,3 μM (7,8 – 8,7)	7,5

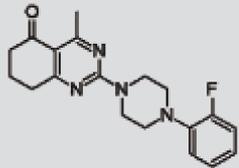
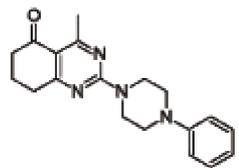
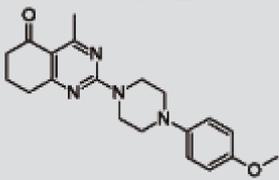
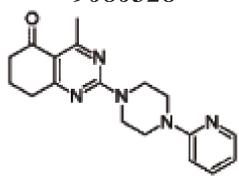
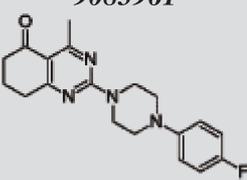
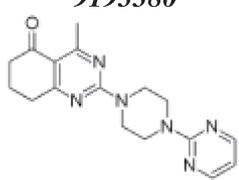
Continua...

Tabela 3.3 – Continuação.

Código/Estrutura	<i>TcG6PDH</i>		<i>HsΔG6PDH</i>		<i>I.S.</i> <sup>d</sup>
	<i>AR80</i> <sup>a</sup>	<i>IC</i> <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( <i>IC95</i> ) <sup>c</sup>	<i>AR80</i> <sup>a</sup>	<i>IC</i> <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( <i>IC95</i> ) <sup>c</sup>	
<b>9126930</b> 	5,6 ± 0,7 %	2,8 μM (2,6 – 2,9)	52,4 ± 5,7 %	23,9 μM (21,9 – 26,1)	8,5
<b>9127078</b> 	4,8 ± 0,5 %	2,2 μM (2,1 – 2,3)	55,5 ± 2,4 %	20,4 μM (18,6 – 22,3)	9,3
<b>9127995</b> 	5,2 ± 0,3 %	6,5 μM (6,2 – 6,8)	58,6 ± 2,2 %	61,7 μM (56,7 – 67,3)	9,5
<b>9134127</b> 	16,4 ± 0,8 %	1,2 μM (1,2 – 1,3)	80,9 ± 1,9 %	-	- <sup>c</sup>
<b>9148049</b> 	2,1 ± 0,3 %	2,1 μM (2,0 – 2,2)	13,9 ± 0,8 %	7,0 μM (6,4 – 7,5)	3,3
<b>9193366</b> 	54,6 ± 3,2 %	36,9 μM (31,6 – 43,1)	99,2 ± 6,0 %	-	-
<b>9210803</b> 	40,5 ± 2,0 %	54,3 μM (48,3 – 61,0)	101,5 ± 7,1 %	-	-
<b>9232989</b> 	48,2 ± 3,4 %	86,7 μM (79,6 – 94,6)	103,0 ± 10,4 %	-	-
<b>9267114</b> 	42,3 ± 1,8 %	16,5 μM (15,1 – 18,0)	98,0 ± 4,2 %	-	-

<sup>a</sup> *AR80*, atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80 μM da molécula testada. Valores apresentados representam média e desvio padrão; <sup>b</sup> *IC*<sub>50</sub>, concentração do inibidor que reduzir a velocidade de reação em 50%; <sup>c</sup> *IC95*, intervalo de confiança de 95%; <sup>d</sup> *I.S.*, Índice de seletividade calculado dividindo os valores de *IC*<sub>50</sub> obtidos para a *HsΔG6PDH* pelos obtidos para a *TcG6PDH*.

**Tabela 3.4** - Atividade das quinazolinonas-piperazina sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (TcG6PDH) e humana (HsΔG6PDH).

Código/Estrutura	TcG6PDH		HsΔG6PDH
	AR80 <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (IC95) <sup>c</sup>	AR80 <sup>a</sup>
<b>9040647</b> 	9,5 ± 1,3 %	3,1 μM (2,9 – 3,4)	92,6 ± 4,9 %
<b>9062385</b> 	7,9 ± 1,5 %	6,8 μM (6,4 – 7,3)	95,9 ± 11,4 %
<b>9068502</b> 	3,4 ± 0,2 %	2,9 μM (2,8 – 3,0)	83,4 ± 8,6 %
<b>9080528</b> 	15,2 ± 1,3 %	19,5 μM (17,5 – 21,7)	99,0 ± 6,5 %
<b>9083961</b> 	15,1 ± 0,8 %	11,2 μM (10,5 – 12,0)	82,8 ± 6,7 %
<b>9193380</b> 	25,4 ± 1,8 %	25,4 μM (23,2 – 27,9)	98,9 ± 3,3 %

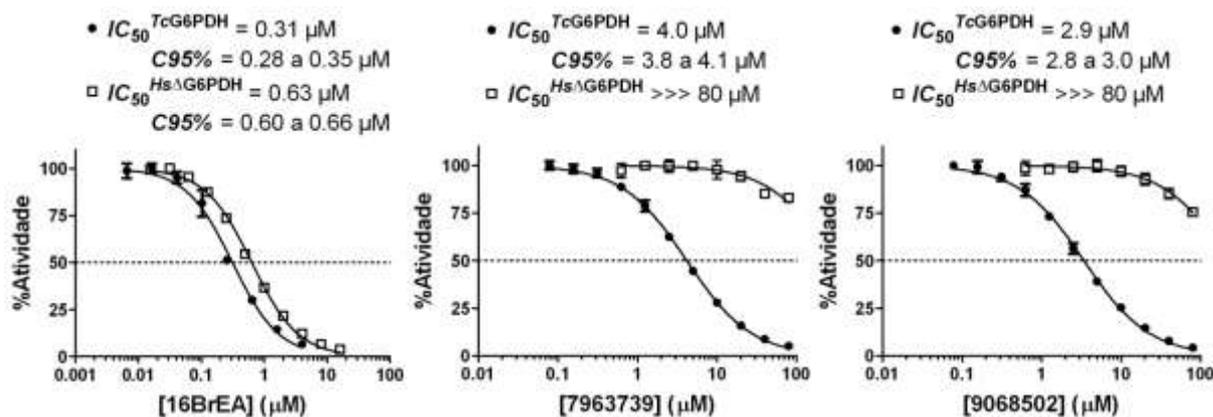
<sup>a</sup> AR80, atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80 μM da molécula testada. Valores apresentados representam média e desvio padrão; <sup>b</sup> IC<sub>50</sub>, concentração do inibidor que reduzir a velocidade de reação em 50%; <sup>c</sup> IC95, intervalo de confiança de 95%.

Os esteroides DHEA, EA e 16BrEA foram descritos anteriormente como potentes inibidores incompetitivos da G6PDH de *T. cruzi*<sup>74</sup> e humanos.<sup>76,92</sup> Apesar dessas enzimas compartilharem uma identidade sequencial de 48%, a semelhança dos valores de  $IC_{50}$  obtidos para os esteroides com a *Tc*- e *Hs* $\Delta$ -G6PDH (Tabela 3.5; Figura 3.10-A) sugeria que alcançar seletividade para esta classe química pode ser uma tarefa desafiadora. Entretanto, o fato da *Tc*G6PDH ser inibida por derivados de esteroides e a *Lm*G6PDH, que compartilha uma identidade de 64 % com a enzima de *T. cruzi*, não ser afetada pelas mesmas moléculas chama a atenção. Com base na identidade que as G6PDHs de tripanosomatídeos compartilham (aproximadamente 65%), é razoável assumir que o sítio para inibidores incompetitivos deve existir nas enzimas de distintas espécies. Assim, a indiferença da *Lm*G6PDH a presença dos esteroides sugere que pode haver diferenças nos sítios de inibidores incompetitivos entre as G6PDHs de diferentes espécies que permitiriam a identificação de inibidores seletivos. A campanha de HTS feita com uma coleção de moléculas de grande diversidade química (DIVERSet, ChemBridge) permitiu a identificação de novos inibidores da *Tc*G6PDH pertencentes às classes químicas das tienopirimidinas e quinazolinonas. Ensaios com a G6PDH de *T. cruzi* e humanos usando os novos inibidores mostraram que inibição seletiva da enzima do parasita poderia ser alcançada em ambas as classes (Figura 3.8; Tabelas 3.2 a 3.4). No caso das tienopirimidinas, mesmo o inibidor mais potente da *Tc*G6PDH não afetava a *Hs* $\Delta$ G6PDH (Figura 3.10-B). Para as quinazolinonas, uma seletividade pronunciada foi observada com derivados que carregavam uma piperazina ligada ao C2 (Figura 3.10-C).

**Tabela 3.5** – Atividade dos esteroides sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (*Tc*G6PDH) e humana (*Hs* $\Delta$ G6PDH).

Código	<i>Tc</i> G6PDH		<i>Hs</i> $\Delta$ G6PDH		I.S. <sup>d</sup>
	AR80 <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (IC95) <sup>c</sup>	AR80 <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (IC95) <sup>c</sup>	
<b>DHEA</b>	33,2 ± 0,8 %	26,7 μM (23,7 - 30,0)	18,6 ± 1,7 %	10,5 μM (10,0 - 11,0)	0,4
<b>EA</b>	1,7 ± 0,9 %	9,8 μM (8,7 - 11,0)	9,5 ± 0,6 %	3,4 μM (3,2 - 3,6)	0,3
<b>16BrEA</b>	3,7 ± 0,3 %	0,31 μM (0,28 - 0,35)	11,8 ± 0,6 %	0,63 μM (0,60 - 0,66)	2,0

<sup>a</sup> AR80, atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80 μM da molécula testada. Valores apresentados representam média e desvio padrão; <sup>b</sup> IC<sub>50</sub>, concentração do inibidor que reduzir a velocidade de reação em 50%; <sup>c</sup> IC95, intervalo de confiança de 95%; <sup>d</sup> I.S., Índice de seletividade calculado dividindo os valores de  $IC_{50}$  obtidos para a *Hs* $\Delta$ G6PDH pelos obtidos para a *Tc*G6PDH.

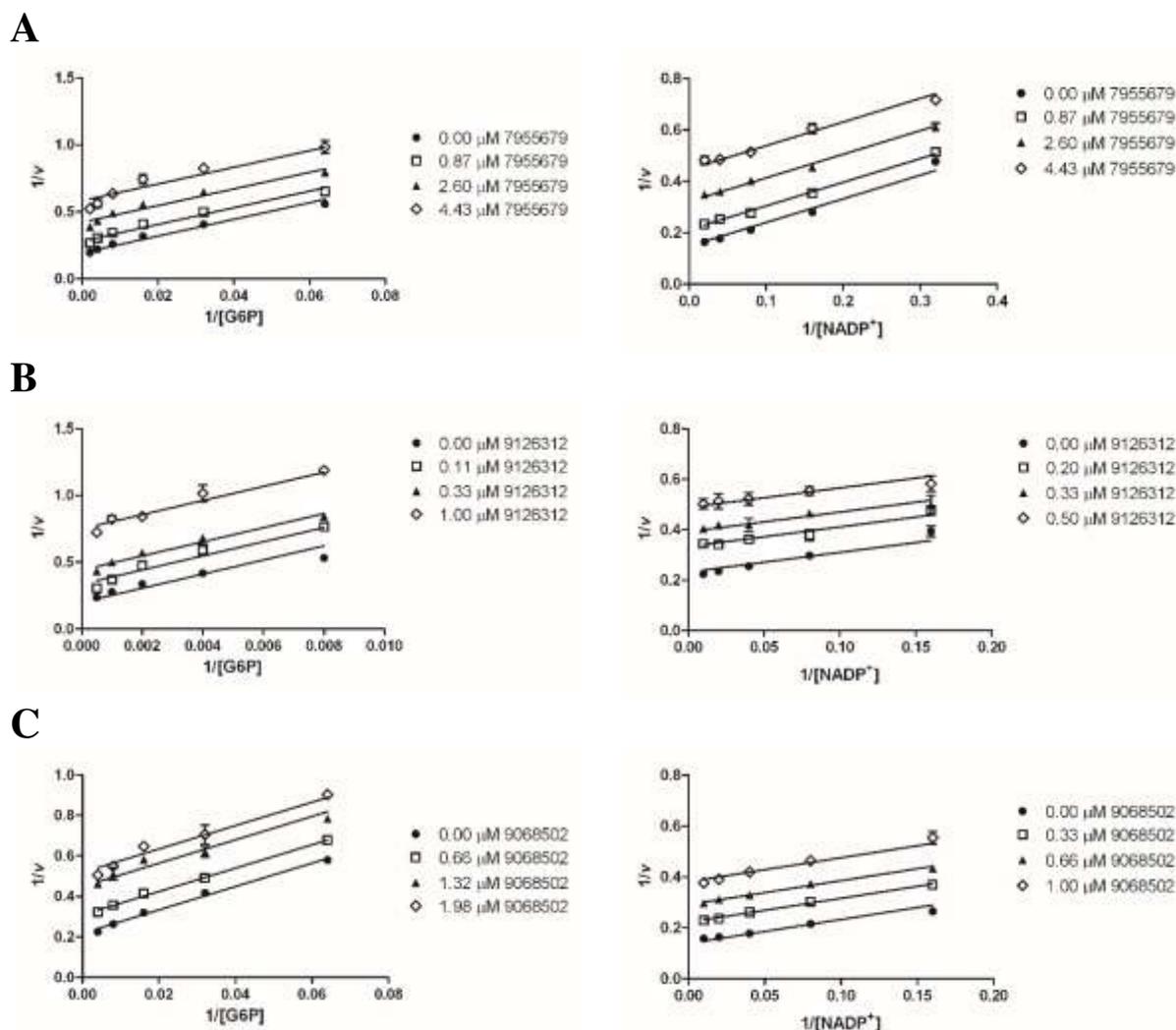


**Figura 3.10** – Curvas concentração-resposta do esteroide 16BrEA (A), da tienopirimidina 7963739 (B) e da quinazolinona 9068502 (C) para a *TcG6PDH* (●) e *HsΔG6PDH* (□). Os novos inibidores identificados por HTS apresentam uma seletividade que não foi observada para os esteroides descritos como inibidores da G6PDH.

### 3.6 – Mecanismo de Inibição

A atividade da G6PDH é altamente suscetível à modulação por inibidores derivados de DHEA. Os esteroides que inibem a G6PDH o fazem por um mecanismo incompetitivo,<sup>74,76,77</sup> indicando que o complexo ternário G6PDH-G6P-NADP<sup>+</sup>, ou uma espécie subsequente, possui um sítio *druggable* para interação com inibidores. Por este motivo, seria esperado que em uma campanha de triagem de inibidores com a G6PDH fossem encontrados, inibidores potentes que atuassem por um mecanismo do tipo incompetitivo. Surpreendentemente, nas campanhas de HTS da *HsG6PDH*<sup>89</sup> e *PfGluPho*<sup>63</sup> (glicose-6-fosfato desidrogenase 6-fosfogliconolactonase de *P. falciparum*) nenhum inibidor incompetitivo foi reportado.

Para determinar o mecanismo de atuação dos novos inibidores da *TcG6PDH* identificados por HTS, escolhemos as moléculas 7955679, 9126312 e 9068502 como representante da classe das tienopirimidinas, quinazolinonas e quinazolinonas-piperazinas. Os gráficos duplo-recíproco obtidos para os três inibidores, variando a concentração de G6P ou NADP<sup>+</sup>, revelam curvas paralelas condizentes com um mecanismo de inibição incompetitivo (Figura 3.11).<sup>3</sup> Os valores de  $\alpha K_i$  obtidos estão reportados na tabela 3.6.



**Figura 3.11** – Gráficos duplo-recíproco de ambos os substratos da *TcG6PDH* obtidos titulando os inibidores identificados por *HTS*. Curvas paralelas características de inibidores incompetitivos, que reduzem tanto os valores aparentes de  $K_m$  quanto de  $V_{max}$  com aumento da concentração do inibidor, foram obtidas na titulação da tienopirimidina 7955679 (A), quinazolinona 9126312 (B) e quinazolinona-piperazina 9068502 (C). Os pontos de interceptação no eixo das abcissas (X) e ordenadas (Y) correspondem aos valores de  $-1/K_m$  e  $1/V_{max}$ , respectivamente. Os valores de  $\alpha K_i$  estão reportados na tabela 3.6.

**Tabela 3.6** – Valores de  $\alpha K_i$  dos inibidores incompetitivos da *TcG6PDH* obtidos contra o substrato G6P e cofator  $NADP^+$ .

	$\alpha K_i$ ( $\mu M$ ) <sup>a</sup>	
	G6P	$NADP^+$
7955679	2,26 ± 0,07	2,02 ± 0,04
9126312	0,36 ± 0,02	0,42 ± 0,01
9068502	1,31 ± 0,05	0,64 ± 0,02

<sup>a</sup> – erro reportado: desvio padrão.

### 3.7 – Relação entre Estrutura e Atividade dos Novos Inibidores da TcG6PDH

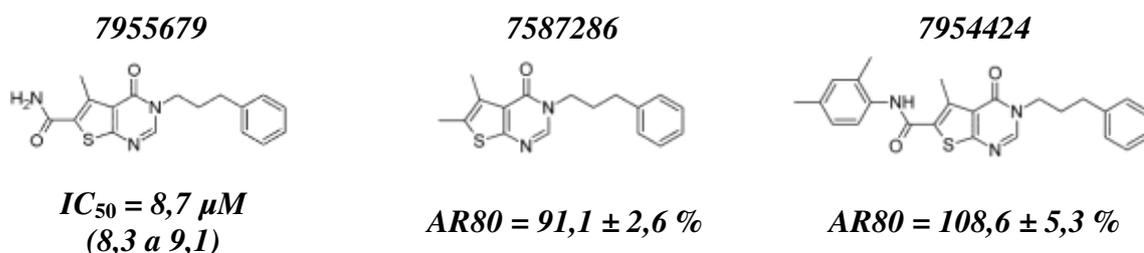
#### 3.7.1 – Derivados de Tienopirimidinas

A análise da relação estrutura-atividade (REA) dos derivados de tienopirimidinas indicam que a presença do grupo carboxamida no C6 e um grupo hidrofóbico no N3 (R1) são relevantes para inibição da TcG6PDH (Figura 3.12).



**Figura 3.12** - Ilustração das principais relações entre estrutura e atividade observadas para os derivados de tienopirimidinas.

A importância da carboxamida para a atividade das tienopirimidinas se torna evidente quando o inibidor 7955679 (Tabela 3.2) é modificado nesta posição, gerando duas moléculas inativas (Figura 3.13). Além disso, a comparação dos valores de  $IC_{50}$  das moléculas 7950825, 7864332 e 7965246 (Tabela 3.2) sugere que cadeias alifáticas longas favorecem a inibição da enzima. Finalmente, tienopirimidinas com potência na faixa de baixo micromolar são obtidas quando grupos aromáticos estão conectados a N3. Como essas moléculas apresentam boa atividade para a enzima de *T. cruzi* e não afetam a enzima humana (Figura 3.10), futuras modificações na cadeia lateral ligada a N3 se mostram promissoras.



**Figura 3.13** – Ilustração da importância do grupo carboxamida para atividade das tienopirimidinas contra TcG6PDH. Valores entre parênteses representam o intervalo de confiança de 95%.  $AR_{80}$  é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu M$  da molécula testada.

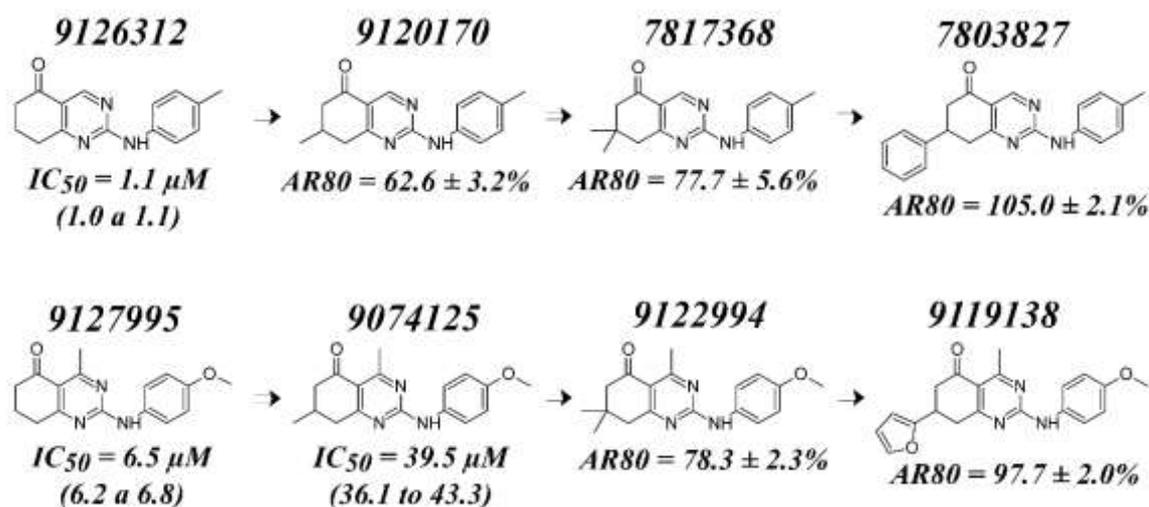
### 3.7.2 – Derivados de Quinazolinonas

O conjunto das quinazolinonas era composto de 80 derivados, sendo que 21 deles apresentavam uma piperazina ligada ao C2. Conforme será detalhado a seguir, a análise dos resultados obtidos com esse conjunto de moléculas resultou nas seguintes padrões de REA: a adição de substituintes volumosos em C7 (R3) é proibida uma vez que gera moléculas inativas; o grupo cetona em C5 é essencial para a atividade; metil em C4 (R2) pode aumentar levemente a seletividade para a enzima do parasita mas também pode reduzir a potência das moléculas; finalmente, substituintes hidrofóbicos na extremidade do C2 (R1) são essenciais para a atividade e variações destes grupos tem efeito tanto na potência quanto na seletividade (Figura 3.14).



**Figura 3.14.** Ilustração das principais relações entre estrutura e atividade observadas para os derivados de quinazolinonas.

A incorporação de substituintes ao C7 (R3) do motivo quinazolinona é deletério para a atividade destas moléculas (Figura 3.15). Substituintes volumosos como os grupos fenil, furil ou tienil são totalmente proibidos, gerando moléculas inativas. Do mesmo modo, são proibidos grupos metoxifenil, butilamino, hidroxifenil e metilfenil. Apesar de algumas moléculas ativas apresentarem um grupo metil em C7, em geral elas apresentam valores de  $IC_{50}$  elevados quando comparadas com moléculas sem nenhuma modificação (tabela 3.3).



**Figura 3.15** – Ilustração mostrando a relação estrutura-atividade da posição C7 (R3) das quinazolinonas contra a *TcG6PDH*. Um aumento no volume do substituinte R3 causa uma diminuição na atividade. Em parênteses estão os intervalos de confiança de 95%. **AR80** é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu M$  da molécula testada.

A remoção da cetona C5 da quinazolinona gera uma quinazolinamina inativa a 80  $\mu M$ , o que sugere que a presença de um aceptor de hidrogênio nesta posição deve ser essencial para atividade das quinazolinonas.

Com relação as substituições no C4 das quinazolinonas (R2), a adição de um grupo metil tem um efeito discreto sobre a atividade das moléculas sobre a *TcG6PDH*. Isso pode ser observado para os seguintes pares de moléculas: 9126312 e 9126930; 9123884 e 9127995; 9121488 e 9116934; 9134127 e 9125232 (Tabela 3.3). Uma interessante observação com relação a posição C4 vem da molécula 9148049, que com um metil gera a molécula 9127078. A molécula metilada apresenta um índice de seletividade 2,8 vezes maior que a molécula original, sugerindo que essa posição poderia ser explorada para aumentar seletividade.

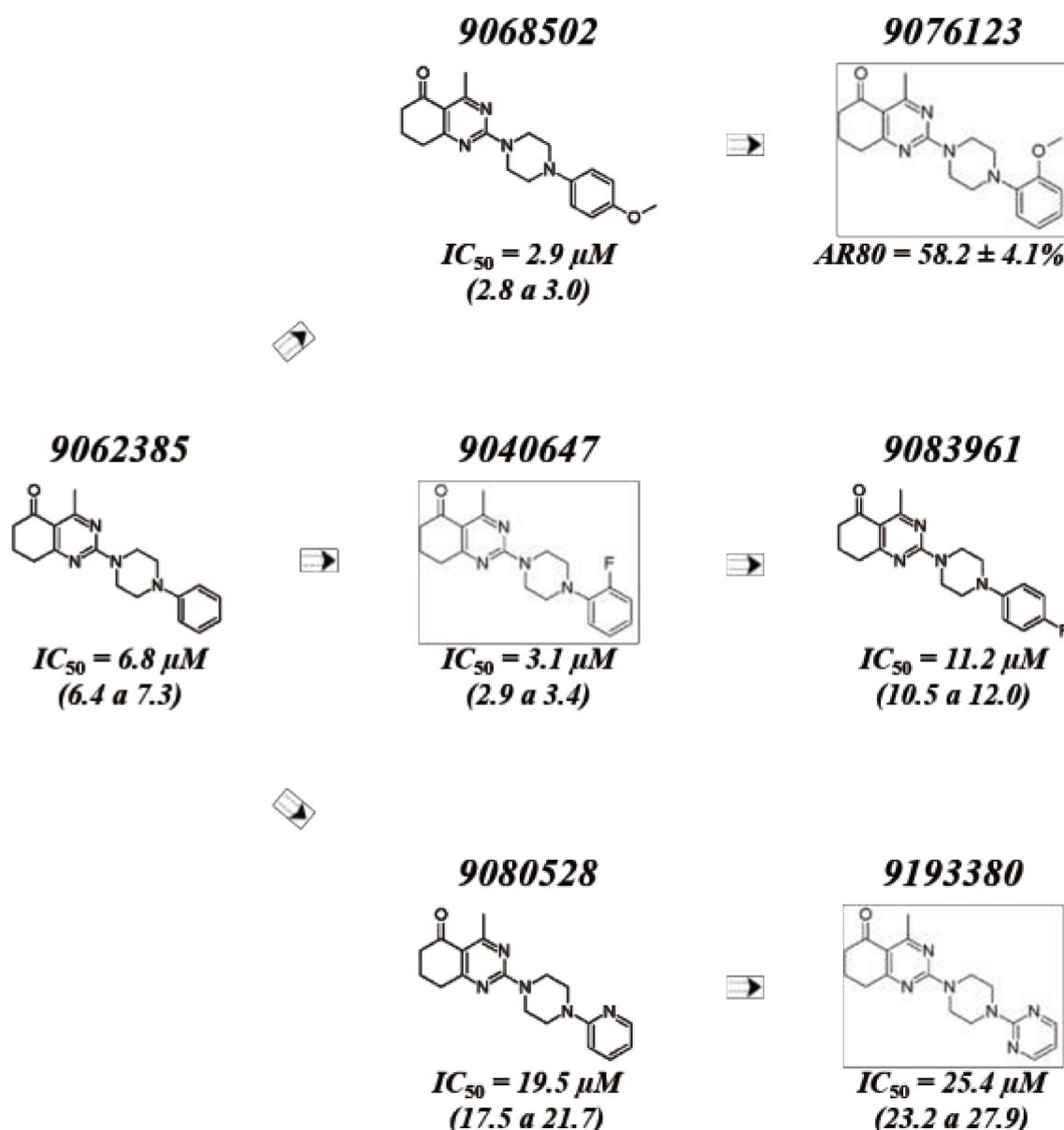
A respeito da posição R1 das quinazolinonas, foi observado que todos os derivativos ativos possuíam um anel aromático conectado ao C2 através de uma amina (Tabela 3.3) ou piperazina (Tabela 3.4). A importância do anel aromático em R1 para a atividade das quinazolinonas é reforçada pelo estudo do fragmento 2-amino-5-quinazolinona, que reduz a atividade da *TcG6PDH* em aproximadamente 10% quando testada a 80  $\mu M$ , enquanto as moléculas 9126312 e 9148049 (Tabela 3.3; Figura 3.8) praticamente levam a inibição total da enzima na mesma concentração.

Uma análise dos radicais em posições *orto*, *meta* e *para* do motivo anilina (R1) traz algumas conclusões interessantes. Primeiro, a mudança do grupo metoxi da anilina da

orientação *para* no derivado 9074125 (Tabela 3.3) para a orientação orto gera uma molécula inativa contra a G6PDH. A comparação das moléculas 9119184, 9126930, 9127078, 9127995, 9116934 e 9125232 (Tabela 3.3) mostra que a adição de um metil, metoxi, flúor ou trifluormetil nas posições *meta* ou *para* do motivo anilina tem efeito discreto no  $IC_{50}$  das moléculas sobre a *TcG6PDH*. Entretanto, os derivados com um metil (9126930 ou 9127078) ou metoxi (9127995) apresentam potência reduzida para *HsΔG6PDH* se comparados ao derivado 9119184, que não apresenta modificações na anilina ligada ao C2. Esse efeito antagonista sobre as enzimas do parasita e humana causa um pequeno aumento na seletividade das moléculas para *TcG6PDH*.

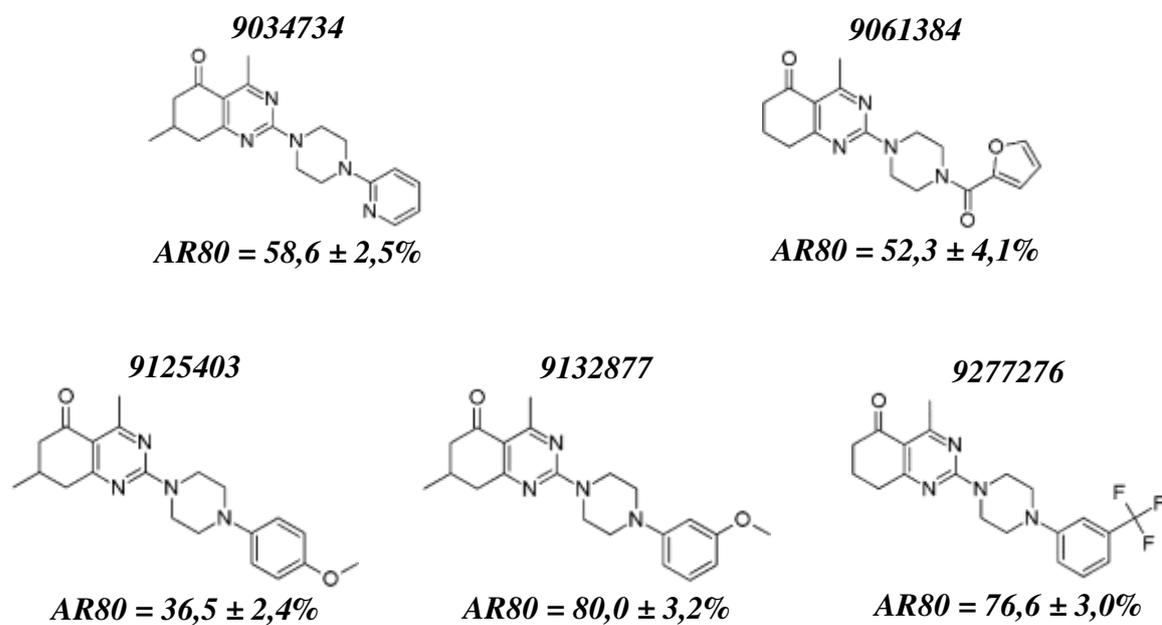
Para moléculas contendo uma metil-anilina ligada a C2 da quinazolinona, a adição de um segundo grupo metil reduz a atividade das moléculas resultantes sobre a *TcG6PDH*. Isso pode ser observado comparando as moléculas 9148049 e 9002823 com os derivados 9033917 e 9232989, respectivamente (Tabela 3.3). Vale destacar que a molécula 9033917 não inibe a enzima humana a 80  $\mu$ M, apesar de ter um  $IC_{50}$  aproximadamente 4 vezes maior que a molécula 9148049.

Uma notável seletividade é observada para os derivados de quinazolinona quando uma piperazina faz uma ponte entre o C2 e um anel aromático (Tabela 3.4). Tomando a molécula 9062385 como referência, notamos que a substituição do anel fenil por um grupo *p*-metoxifenil (9068502) ou *o*-fluor-fenil (9040647) gera os dois derivados mais potentes deste conjunto de moléculas (Figura 3.16). A mudança grupo *p*-metoxifenil da molécula 9068502 para *o*-metoxifenil na molécula 9076123 leva a uma redução considerável na atividade. Similarmente, a mudança do flúor ligado ao grupo fenil da posição *orto* na molécula 9040647 para orientação *para* no derivado 9083961 leva a uma redução no  $IC_{50}$  de 3,6 vezes (Tabela 3.4; Figura 3.16). Além disso, a substituição do grupo fenil da molécula 9062385 por piridina ou pirimidina nos derivados 9080528 e 9193380, respectivamente, reduz consideravelmente o  $IC_{50}$  das moléculas (Tabela 3.4; Figura 3.16).



**Figura 3.16** – Atividade de derivados de quinazolinonas-piperazinas contra a *TcG6PDH*. Em parênteses estão os intervalos de confiança de 95%. *AR80* é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu M$  da molécula testada.

Finalmente, na figura 3.17 estão representadas as estruturas de alguns derivados de quinazolinonas-piperazinas que mostraram alguma atividade para a *TcG6PDH* a 80  $\mu M$ , mas que não tiveram o valor de  $IC_{50}$  determinado por limitações imposta pela solubilidade da molécula em tampão aquoso. Conforme predito, os derivados com grupo metil no C7 do motivo quinazolinona (9034734, 9125403 e 9132877) acabam tendo atividade reduzida. Além disso, nota-se que modificações no grupo fenil ligado ao motivo piperazina podem ter resultados negativos para a atividade contra a *TcG6PDH*.



**Figura 3.17** – Atividade de derivados de quinazolinonas-piperazinas contra a *TcG6PDH*.  $AR_{80}$  é a atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80  $\mu\text{M}$  da molécula testada. Valores reportados referem-se as médias e desvios padrões.

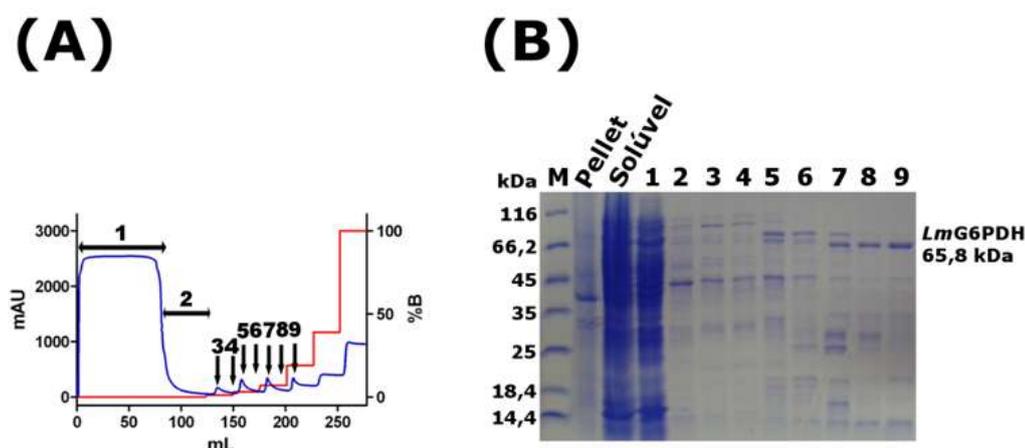
## Capítulo 4

*Produção, Caracterização Cinética e  
Inibição da G6PDH de L. mexicana  
por Quinazolinonas*

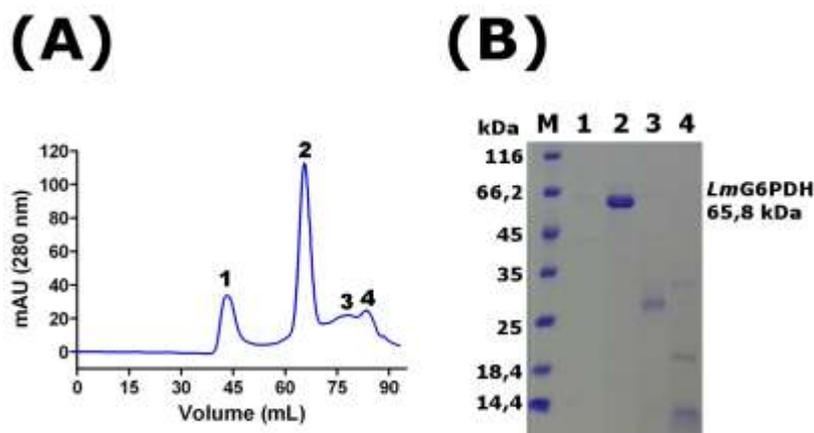
## 4 – Inibição da G6PDH de *L. mexicana* por Quinazolinonas

### 4.1 – Produção e Purificação da *LmG6PDH*

Como descrito na metodologia, o gene da *LmG6PDH* foi clonado em um vetor de expressão da família pET de modo que ao ser traduzida a proteína possui uma cauda de histidina N-terminal.<sup>73</sup> Deste modo, a proteína recombinante foi recuperada do lisado bacteriano usando uma cromatografia de afinidade (Figura 4.1). A amostra obtida nesse processo apresentava algumas proteínas de baixo peso molecular, que foram removidos por cromatografia de exclusão molecular para se obter uma amostra homogênea da *LmG6PDH* (Figura 4.2).



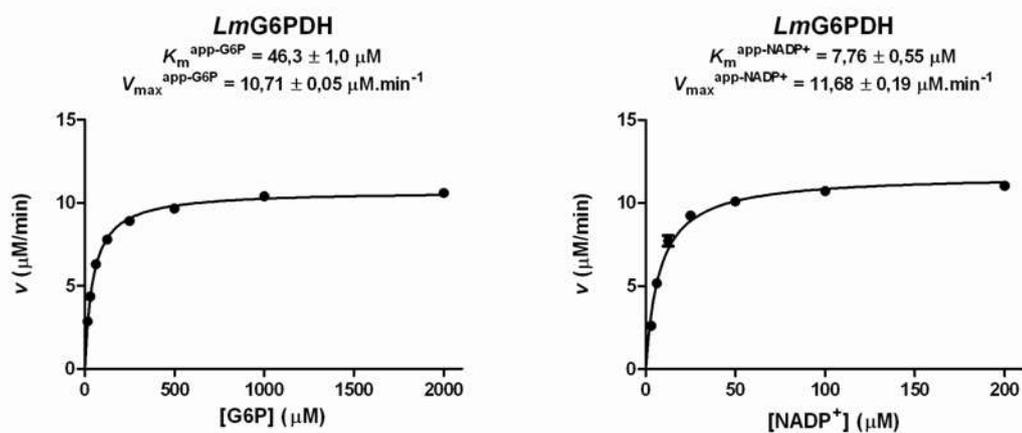
**Figura 4.1** – Cromatografia de afinidade da *LmG6PDH*. **A)** Cromatograma mostrando porcentagem do tampão B3 usado para gerar gradiente de imidazol (20, 40, 80, 200, 400 e 1.000 mM). Setas no cromatograma indicam as frações usadas no SDS-PAGE, numeradas de acordo com as colunas do gel. **B)** Gel de poliacrilamida 12% mostrando que a *LmG6PDH* eluí com 80 e 200 mM imidazol (colunas 7-9), apresentando contaminantes de baixo peso molecular. Proteínas reveladas com Azul de Coomassie. Coluna M, marcador de massa molecular.



**Figura 4.2** – Cromatografia de exclusão molecular da *LmG6PDH*. **A)** Cromatograma de eluição isocrática mostrando o perfil de eluição das proteínas. Frações indicadas por números foram analisadas por SDS-PAGE. **B)** SDS-PAGE das amostras obtidas durante cromatografia mostrando que a *LmG6PDH* (coluna 2) foi separada de outras proteínas de baixo peso molecular (colunas 3 e 4). Gel de poliacrilamida 12% revelado com Azul de Coomassie. Coluna M, marcador de massa molecular.

## 4.2 – Atividade Catalítica da *LmG6PDH*

A fim de avaliar a atividade da *LmG6PDH* purificada, foram realizados ensaios cinéticos com a enzima. Os valores de  $K_m^{\text{app}}$  do G6P e do  $\text{NADP}^+$  obtidos para a *LmG6PDH* (Figura 4.3) estavam dentro do esperado, já os valores de afinidade ( $K_{\text{G6P}}$  e  $K_{\text{NADP}^+}$ ) reportados anteriormente para o substrato e cofator eram iguais a  $74,5 \pm 3,0$  e  $12,1 \pm 0,5$ , respectivamente.



**Figura 4.3** – Gráficos de Michaelis-Menten do G6P e  $\text{NADP}^+$  para a *LmG6PDH*. Os valores de  $K_m$  e  $V_{\text{max}}$  aparentes estão reportados acima das curvas de Michaelis-Menten.

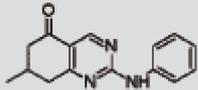
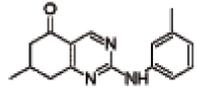
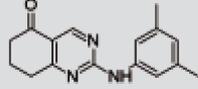
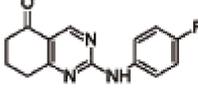
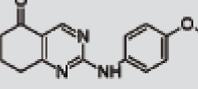
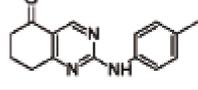
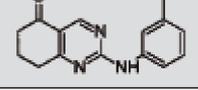
### 4.3 – Inibição da *LmG6PDH* por derivados de Quinazolinona

A capacidade de androstanas e pregnanas modular a atividade de G6PDH de mamíferos foi descrita pela primeira vez a quase sete décadas<sup>75</sup> e estudos posteriores revelaram um mecanismo ação incompetitivo para essas moléculas.<sup>76,77</sup> Mais recentemente, foi demonstrado que derivados de DHEA inibem a G6PDH de *Trypanosoma* pelo mesmo mecanismo,<sup>72-74</sup> mas não têm efeito sobre a *LmG6PDH*.<sup>73</sup>

Uma interessante observação sobre a G6PDH de *L. mexicana* é que esta enzima compartilha uma identidade relativamente alta com as enzimas homólogas de *T. cruzi*, *T. brucei* e humanos (64, 62 e 50%, respectivamente). Assim, seria esperado que o sítio de interação com inibidores incompetitivos fosse preservado na *LmG6PDH*. Como a quantidade de derivados de esteroides testado contra a *LmG6PDH* foi restrita (DHEA e EA),<sup>73</sup> uma das nossas hipóteses é que outros inibidores incompetitivos poderiam inibir esta enzima. Para testar essa hipótese resolvemos avaliar se os novos inibidores da *TcG6PDH* identificados por HTS poderiam ter algum efeito sobre a enzima de *Leishmania*. Sete derivados de quinazolinonas mostram efeito inibitório contra a *LmG6PDH*, possuindo valores de  $IC_{50}$  na faixa de 12,5 a 42,1  $\mu\text{M}$  (Tabela 4.1).

A comparação derivados de quinazolinonas ativos contra a *LmG6PDH* e *TcG6PDH* mostra algumas diferenças notáveis. Primeiro, que os inibidores são menos potentes contra enzima de *Leishmania*. Uma diferença de até 16,5 vezes nos valores de  $IC_{50}$  de um mesmo derivado pode ser observada, como no caso do derivado 9123884 que possui valores de  $IC_{50}$  iguais a 2,0 e 33,0  $\mu\text{M}$  para as enzimas de *T. cruzi* e *L. mexicana*, respectivamente. Segundo, que nenhum derivado com grupo metil em C4 (figura 3.14) possui atividade para *LmG6PDH*. Todos os derivados de quinazolinonas contendo o motivo piperazina testados contra as G6PDHs possuem um metil em C4, o que pode explicar porque não se observou inibição da *LmG6PDH* por essas moléculas. Assim, estudos de inibição da *LmG6PDH* por quinazolinonas-piperazinas, que não contenham grupo metil em C4, podem levar a identificação de inibidores mais potentes e potencialmente seletivos.

**Tabela 4.1** - Atividade das quinazolinonas sobre a glicose-6-fosfato desidrogenase de *L. mexicana* (*LmG6PDH*) e humana (*HsΔG6PDH*).

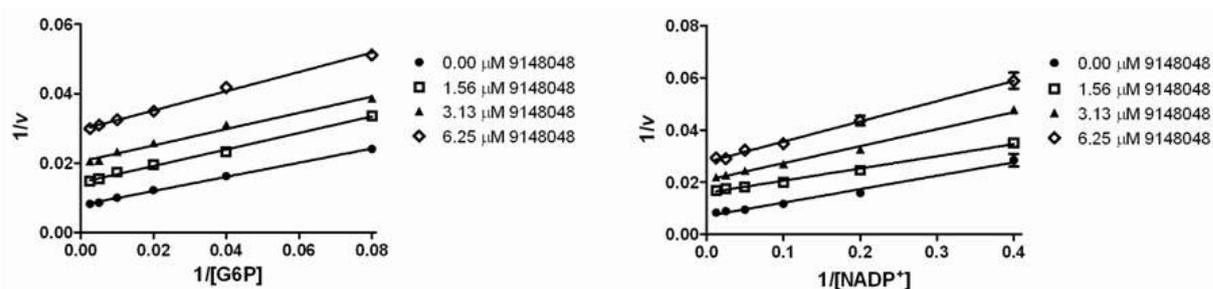
Código/Estrutura	<i>LmG6PDH</i>		<i>HsΔG6PDH</i>		<i>I.S.</i> <sup>d</sup>
	<i>AR80</i> <sup>a</sup>	<i>IC</i> <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( <i>IC</i> <sub>95</sub> ) <sup>c</sup>	<i>AR80</i> <sup>a</sup>	<i>IC</i> <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( <i>IC</i> <sub>95</sub> ) <sup>c</sup>	
7972305 	40,7 ± 2,5 %	42,1 μM (37,3 – 47,4)	66,1 ± 3,4 %	74,8 μM (70,2 – 79,7)	1,8
9002823 	33,1 ± 0,7 %	23,0 μM (21,7 – 24,5)	81,0 ± 8,3 %	-	-
9033917 	29,4 ± 0,8 %	31,4 μM (29,8 – 33,1)	81,8 ± 4,2 %	-	-
9121488 	18,8 ± 1,2 %	15,7 μM (14,8 – 16,6)	15,5 ± 0,9 %	8,5 μM (8,0 – 8,9)	0,5
9123884 	29,8 ± 0,7 %	33,0 μM (31,6 – 34,5)	26,6 ± 0,8 %	19,3 μM (18,3 – 20,3)	0,6
9126312 	27,2 ± 1,7 %	13,5 μM (12,9 – 14,1)	15,9 ± 1,7 %	8,3 μM (7,8 – 8,7)	0,6
9148049 	15,4 ± 0,4 %	12,5 μM (12,0 – 12,9)	13,9 ± 0,8 %	7,0 μM (6,4 – 7,5)	0,56

<sup>a</sup> *AR80*, atividade enzimática remanescente obtida na presença de 80 μM da molécula testada. Valores apresentados representam média e desvio padrão; <sup>b</sup> *IC*<sub>50</sub>, concentração do inibidor que reduzir a velocidade de reação em 50%; <sup>c</sup> *IC*<sub>95</sub>, intervalo de confiança de 95%; <sup>d</sup> *I.S.*, Índice de seletividade calculado dividindo os valores de *IC*<sub>50</sub> obtidos para a *HsΔG6PDH* pelos obtidos para a *LmG6PDH*.

#### 4.4 – Mecanismo de Inibição

A molécula *9148049* foi usada nos experimentos de determinação do mecanismo de inibição das quinazolinonas sobre a enzima *LmG6PDH* (Figura 4.4). Assim como observado para a *TcG6PDH*, os gráficos duplo-recíproco obtidos para a *LmG6PDH* variando a concentração de G6P ou NADP<sup>+</sup> e titulando o derivado de quinazolinona *9148048*, revelam curvas paralelas condizentes com um mecanismo de inibição incompetitivo. Esse experimento

confirma nossa hipótese da existência de um sítio para interação para este tipo de inibidores na *LmG6PDH*. Entretanto, o fato de DHEA e EA não inibirem a enzima de *L. mexicana* e as quinazolinonas serem menos potentes para esta enzima, do que para as G6PDHs de *T. cruzi* e humanos, sugere que o sítio de ligação de inibidores incompetitivos da *LmG6PDH* deve ser mais restritivo.



**Figura 4.4** – Gráficos duplo-recíproco de ambos os substratos da *LmG6PDH* obtidos titulando o inibidor 9148049. Curvas paralelas obtidas são características de inibidores incompetitivos, que reduzem tanto os valores aparentes de  $K_m$  quanto de  $V_{max}$  com aumento da concentração do inibidor. Os pontos de interceptação no eixo das abscissas (X) e ordenadas (Y) correspondem aos valores de  $-1/K_m$  e  $1/V_{max}$ , respectivamente. Os valores de  $\alpha K_i$  obtidos contra o G6P e  $NADP^+$  foram  $1,89 \pm 0,05 \mu M$  e  $1,70 \pm 0,06 \mu M$ , respectivamente.

# Capítulo 5

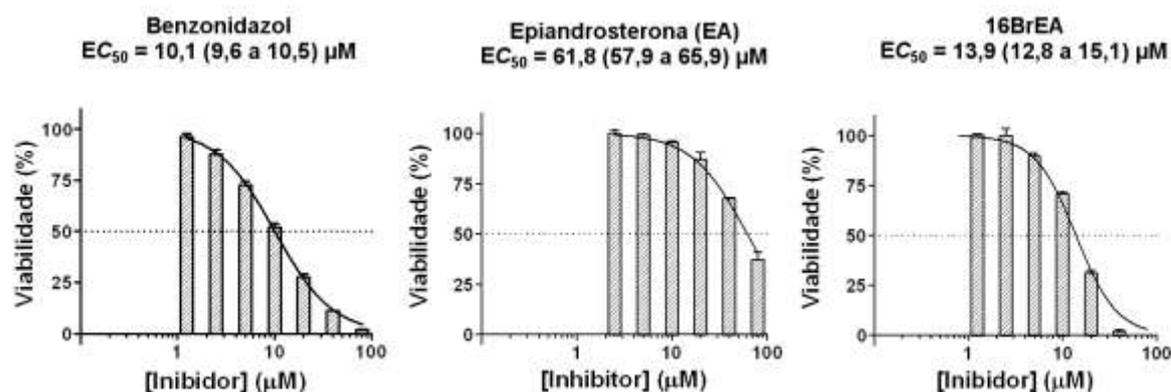
*Efeito das Quinazolinonas e  
Tienopirimidinas  
sobre T. cruzi*

## 5 – Avaliação do Efeito das Quinazolinonas e Tienopirimidinas sobre *Trypanosoma cruzi*

A essencialidade da G6PDH para a sobrevivência de parasitas protozoários foi demonstrada anteriormente.<sup>61</sup> Para o parasita *Trypanosoma brucei*, causador da doença do Sono em humanos e nagana no gado, tanto a depleção dos níveis de G6PDH quanto à inibição enzimática por derivados de DHEA levam o parasita à morte.<sup>72,73</sup> Além disso, os esteroides EA, 16BrEA e 16BrDHEA mostraram ser potentes inibidores da *TcG6PDH* e tóxicos para a forma epimastigota do parasita *T. cruzi*.<sup>74</sup>

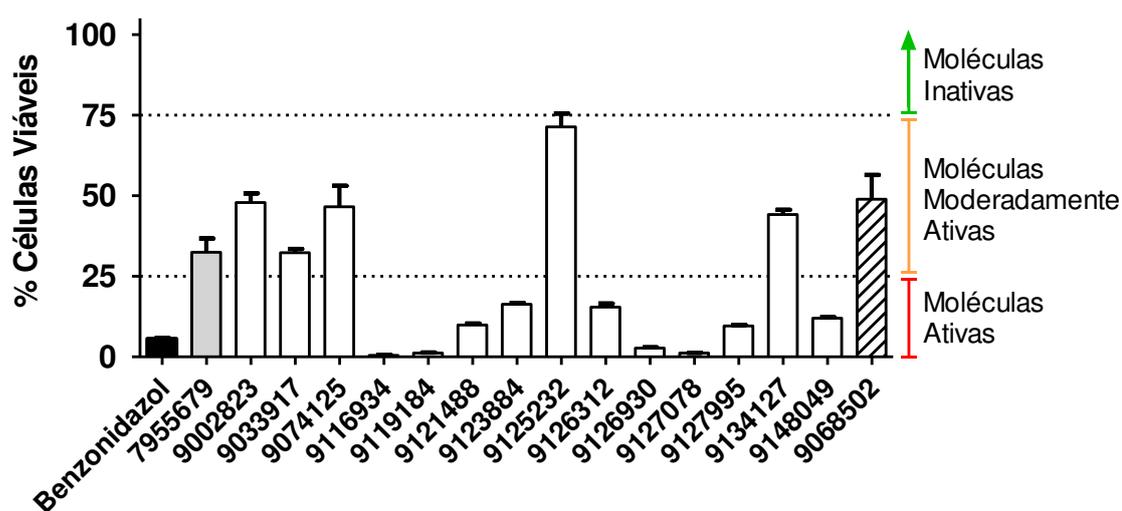
O efeito dos novos inibidores da *TcG6PDH* pertencentes as classes das tienopirimidinas, quinazolinonas e quinazolinonas-piperazinas sobre a viabilidade da forma epimastigota do parasita *T. cruzi* foi avaliada usando a cepa Y do parasito. Essa cepa foi escolhida para os ensaios in vitro por ser moderadamente resistente ao benzonidazol,<sup>114,115</sup> droga que continua sendo a principal alternativa clínica para tratamento da doença de Chagas. Conforme mencionado no Capítulo 2 (Seção 2.3), após o tratamento com moléculas teste os reagentes MTS/PMS foram usados para determinar se os parasitos continuavam metabolicamente ativos, levando a formação de formazan. Uma vez que células mortas perdem rapidamente sua capacidade metabólica, a conversão de MTS a formazan foi correlacionada com viabilidade dos parasitos.

Inicialmente, os valores de  $EC_{50}$  de moléculas com comprovado efeito tripanocida foram determinados usando forma epimastigota do parasita *T. cruzi* (cepa Y) (Figura 6.1). Os valores de  $EC_{50}$  obtidos para o benzonidazol, EA e 16BrEA reproduziam bem os dados observados da literatura.<sup>74,116,117</sup>



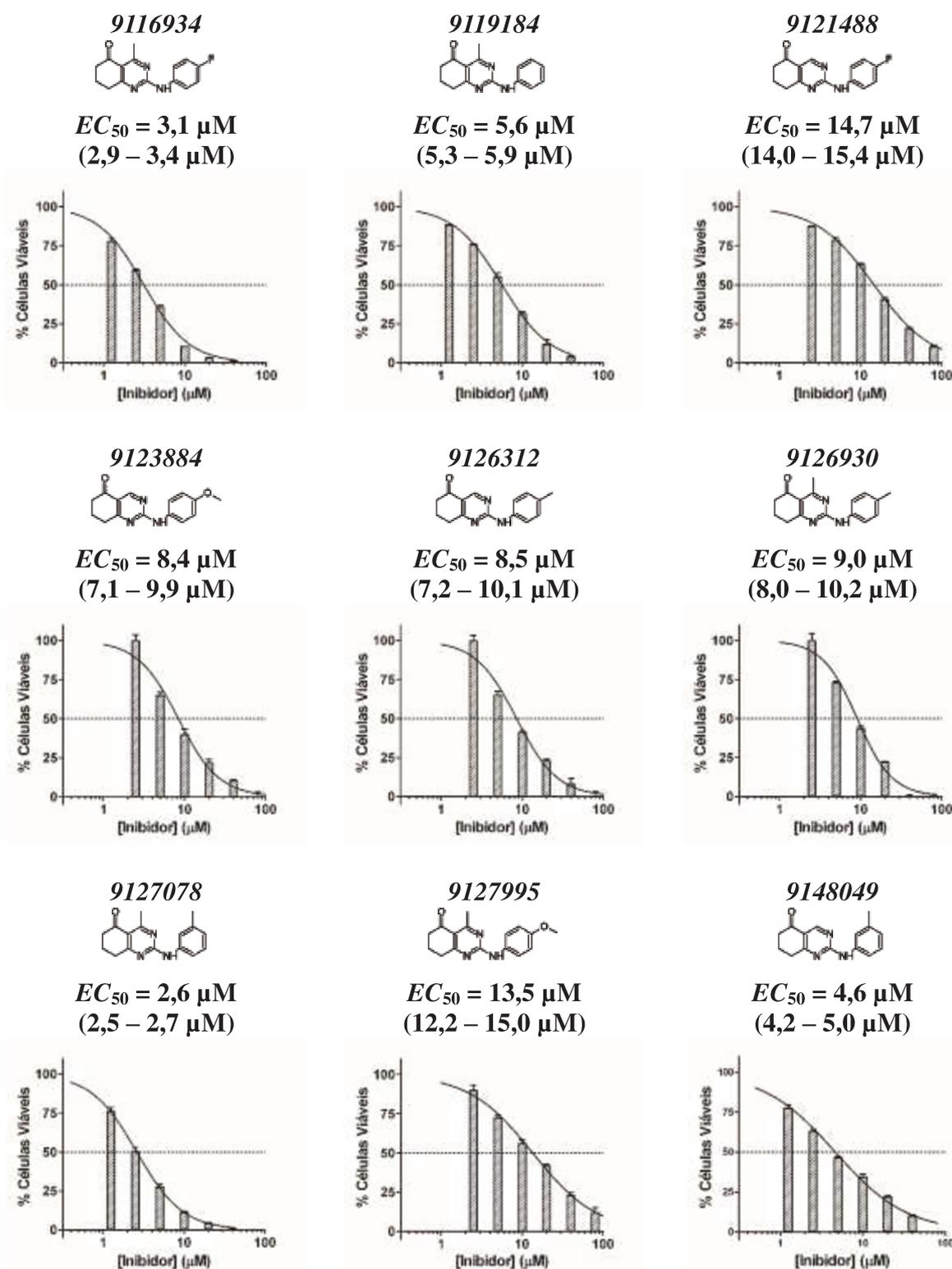
**Figura 5.1** – Valores de  $EC_{50}$  do EA, 16BrEA e Benzonidazol para a forma epimastigota de *T. cruzi* cepa Y. Os valores de  $EC_{50}$  obtidos estão de acordo com os dados de literatura.

Dentre os inibidores da *TcG6PDH* pertencentes aos grupos das tienopirimidinas, quinazolinonas e quinazolinonas-piperazina, os mais potentes ( $IC_{50}^{TcG6PDH} \leq 15 \mu M$ ) foram selecionados para realizar um ensaio de viabilidade a uma dose de  $80 \mu M$  com a forma epimastigota de *T. cruzi* cepa Y. Apesar das moléculas 7963739, 9040647, 9062385 e 9083961 apresentarem um  $IC_{50}$  para a *TcG6PDH* menores que  $15 \mu M$  (Tabelas 3.2 e 3.4), elas não foram incluídas nestes experimentos, pois foram adquiridas em um momento posterior a execução destes ensaios. Dentre as moléculas testadas, 14 derivados de quinazolinonas reduziram a viabilidade do *T. cruzi* para menos de 75%, sendo que 9 destas moléculas reduziram a viabilidade abaixo de 25%, enquanto 1 tienopirimidina e 1 quinazolinona-piperazina também mostraram uma atividade moderada contra o parasita (Figura 5.2).



**Figura 5.2** – Atividade tripanocida dos inibidores da glicose-6-fosfato desidrogenase. Estão representados os derivados ativos ou moderadamente ativos pertencentes aos grupos das tienopirimidinas (barra cinza), quinazolinonas (barras brancas) e quinazolinona-piperazina (barra tracejada). O benzonidazol (barra preta), adicionado como controle, não atua sobre a G6PDH. Todas as moléculas foram testadas a uma concentração de  $80 \mu M$  com a forma epimastigota de *T. cruzi* cepa Y.

Os 9 derivados de quinazolinona que reduziram a viabilidade da forma epimastigota de *T. cruzi* (cepa Y) para menos de 25% a uma concentração de  $80 \mu M$  foram usados para realizar ensaios concentração-resposta. Os valores de  $EC_{50}$  obtidos para estas quinazolinonas (Figura 5.3) são da mesma ordem de grandeza que o valor observado para o benzonidazol (Figura 5.1), fármaco atualmente usado para tratar a doença de Chagas.



**Figura 5.3** – Ensaio concentração-resposta dos derivados de quinazolinona contra *T. cruzi* cepa Y. Os ensaios foram feitos com a forma epimastigota do parasito. Os valores de  $EC_{50}$  foram obtidos por regressão não-linear usando o software GraphPad Prism. Em parênteses representam intervalos de confiança de 99%.

Os tripanosomatídeos utilizam preferencialmente glicose como fonte de energia quando essa molécula está disponível, metabolizando este carboidrato majoritariamente pelas vias glicolítica e de pentoses-fosfato.<sup>46,47</sup> Uma vez que os inibidores da *TcG6PDH* encontrados até a presente data mostraram ser capazes de reduzir a viabilidade da forma epimastigota do *T. cruzi* quando este é cultivado em meio rico em glicose, espera-se que essas moléculas possuam atividade contra as forma tripomastigotas encontradas no sangue hospedeiro mamífero. Essa ideia é reforçada pelo fato da *G6PDH* ser essencial para a forma sanguínea do *T. brucei*.<sup>72,73</sup> A situação é um pouco diferente quando o parasito não tem glicose disponível, pois a manutenção do fluxo na via de pentose dependeria da via gliconeogênica. A gliconeogênese já foi demonstrada em *Leishmania*<sup>58</sup> e *T. brucei*<sup>56</sup>, mostrando ser importante para esses parasitos. No caso do *T. cruzi*, sabe-se que enzimas envolvidas no metabolismo de aminoácidos são importante para a viabilidade de formas replicativas e infectivas do parasita.<sup>55</sup> Além disso sabe-se que a *G6PDH* está presente em todos os estágios do ciclo biológico do parasito, sendo que a forma amastigota intracelular é aquela com maior nível de expressão da enzima.<sup>90</sup> Assim, é provável que na forma amastigota de *T. cruzi*, que pode utilizar aminoácidos como fonte de carbono, o fluxo através da via de pentoses-fosfato seja mantido através da gliconeogênese. De fato, inibidores da enzima *6PGDH* (6-Fosfogliconato Desidrogenase) afetam a proliferação de formas amastigotas de *Leishmania* e *T. cruzi*,<sup>60</sup> reforçando a idéia que a via de pentoses deve ter um papel essencial para os tripanosomatídeos. Estudos futuros serão importantes para determinar se as quinazolinonas e tienopirimidinas ativas contra a enzima *TcG6PDH* possuem atividade contra as formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*, bem como se essas moléculas são bem toleradas por células de mamíferos.

# Capítulo 6

*Produção, Caracterização Cinética e  
Estudos Estruturais da G6PDH  
Truncada  
de Trypanosomatídeos*

## 6 – Estudos Estruturais e Cinéticos das G6PDHs Truncadas

### 6.1 - Construções truncadas das G6PDHs de *T. cruzi* e *L. mexicana*

Até a presente data, foram determinadas as estruturas das G6PDHs de apenas quatro organismos, sendo eles *Leuconostoc mesenteroides* (*LmesG6PDH*), *Micobacterium avium* (*MaG6PDH*), humanos (*HsG6PDH*) e *Trypanosoma cruzi* (*TcG6PDH*). As enzimas oriundas de bactéria são as que apresentam maior resolução, podendo chegar a 2,0 Å para *LmesG6PDH*<sup>81</sup> e 2,3 Å para *MaG6PDH*<sup>88</sup>. Para a *HsG6PDH* o modelo de maior resolução chega a 2,5 Å. Já no caso da *TcG6PDH*, existem dois modelos cristalográficos, sendo que o de maior resolução (2,85 Å) não possui nenhum ligante e o complexo com o G6P é de baixa resolução (3,35 Å). A comparação das sequências de aminoácidos das G6PDHs de *L. mesenteroides* (acesso: WP\_010278795.1) e *M. avium* (acesso: WP\_009975401.1) com as enzimas de *T. cruzi* (acesso: XP\_820060.1), *L. mexicana* (acesso: AAO37825.1) e humanos (acesso: NP\_001035810.1) mostra que as proteínas de eucariotos possuem uma extensão em N-terminal não observada em procariotos (Figura 6.1). Quando as primeiras estruturas da *HsG6PDH* foram resolvidas, percebeu-se que essa cauda N-terminal era desordenada. A deleção dos 25 resíduos de aminoácidos iniciais resultou em uma variante da enzima humana (*HsΔG6PDH*) que produziu cristais melhores, que difratavam até uma resolução de 2,5 Å, sem comprometer as propriedades cinéticas da enzima.<sup>85,86,118</sup>

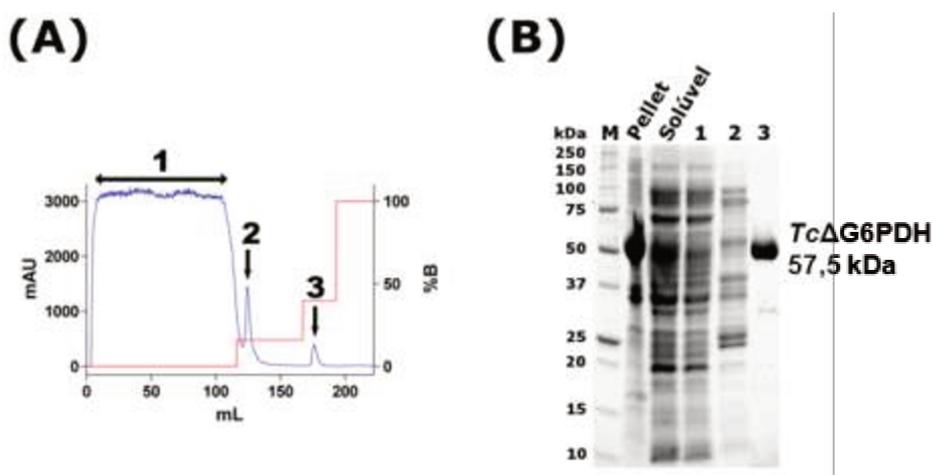
No caso da *TcG6PDH*, duas metioninas (Met1 e Met38) são encontradas na região N-terminal (Figura 6.1), levantando a hipótese que duas formas da proteína poderiam ser traduzidas pelo *T. cruzi*. Embora a forma longa da enzima (*TcG6PDH*; Met1 a Ala555) seja produzida pelo parasito,<sup>90</sup> foi com a forma curta (*TcG6PDH-S*; Met38 a Ala555) que se obteve os primeiros cristais da G6PDH de *T. cruzi*.<sup>87</sup> Entretanto, conforme mencionado os cristais da *TcG6PDH-S* difratavam a uma resolução máxima de 2,85 Å. Visando a obtenção da estrutura de complexos das G6PDHs de tripanosomatídeos com ligantes a uma maior resolução, variantes das G6PDHs de *T. cruzi* (*TcΔG6PDH*; Asp58 a Thr545) e *L. mexicana* (*LmΔG6PDH*; Ser60 a Gln551) (Figura 6.1). Genes contendo sequências de nucleotídeos que codificam para a *TcΔG6PDH* e *LmΔG6PDH* foram clonadas em plasmídeos do sistema pET de modo que as proteínas eram produzidas com uma cauda de histidina que permitia sua purificação por cromatografia de afinidade por metal.



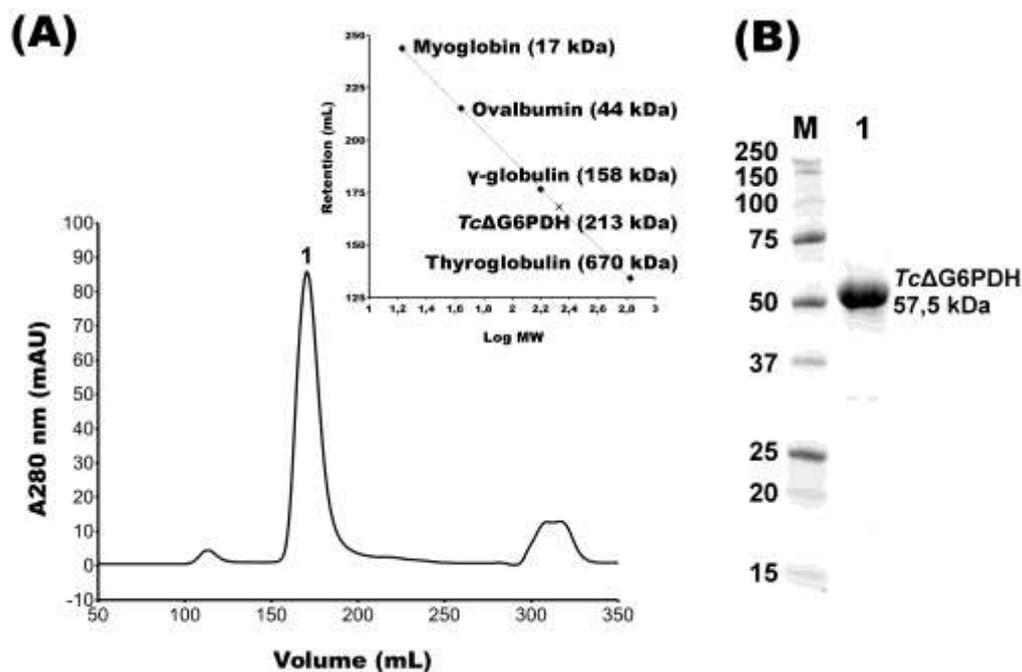
**Figura 6.1** – Alinhamento das sequências de G6PDHs de *T. cruzi* (Tc), *Humanos* (Hs), *M. avium* (Ma) e *L. mesenteroides* (Lmes). Met1 (amarelo) e Met38 (azul) são os primeiros aminoácidos da TcG6PDH longa e curta, respectivamente. Asp58 (laranja) e Thr545 (vermelho) são o primeiro e último resíduo da TcΔG6PDH, respectivamente. Ser60 (magenta) e Gln551 (verde) marcam o início e fim da LmΔG6PDH, respectivamente. Resíduos que reconhecem o G6P (retângulos vermelhos), NADP(H) catalítico (retângulos azuis) ou NADP<sup>+</sup> estrutural (retângulos pretos) estão destacados. As setas (↓) indicam resíduos que formam uma cavidade abaixo do sítio do NADP(H) catalítico.

## 6.2 – Produção e Purificação da *Tc*ΔG6PDH e *Tc*G6PDH-TEV

Estudos anteriores com a *Tc*G6PDH mostraram que uma pequena quantidade da enzima é obtida na forma solúvel por produção heteróloga em *E. coli*.<sup>90</sup> Entretanto, de acordo com os autores uma quantidade substancial da forma curta da enzima (*Tc*G6PDH-S) era obtida usando o mesmo sistema de expressão. No caso da *Tc*ΔG6PDH, cerca de 5 mg de proteína solúvel eram recuperados por litro de cultura, sendo que a amostra obtida na cromatografia de afinidade apresentava bom grau de pureza (Figura 6.2). Quando essa amostra era submetida a uma cromatografia de exclusão molecular, uma amostra homogênea de tetrâmeros da *Tc*ΔG6PDH era obtida (Figura 6.3), o que está de acordo com os dados publicados para a *Tc*G6PDH-S.<sup>87</sup>

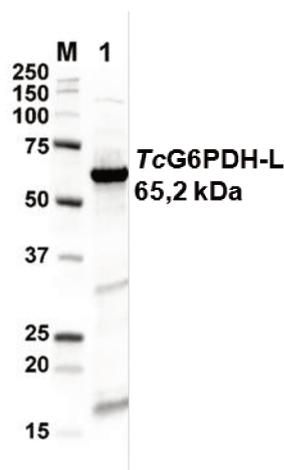


**Figura 6.2** – Cromatografia de afinidade da *Tc*ΔG6PDH. **A)** Cromatograma obtido por medida da absorbância a 280 nm, mostrando gradiente do tampão B. Setas no cromatograma indicam as frações usadas no SDS-PAGE, numeradas de acordo com as colunas do gel. **B)** Gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) obtido em condição desnaturante (SDS-PAGE) mostra que a *Tc*ΔG6PDH (coluna 5) elui com elevado grau de pureza quando concentração de imidazol está próxima de 200 mM imidazol. Detecção das proteínas feita por fluorescência usando sistema de detecção livre de corante Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa.



**Figura 6.3** – Cromatografia de exclusão molecular da *Tc $\Delta$ G6PDH* e análise da estrutura quaternária. **A)** Cromatograma de eluição isocrática mostra que uma amostra homogênea da proteína elui com uma estrutura quaternária correspondente a um tetrâmero (gráfico do canto superior direito). **B)** SDS-PAGE da amostra da *Tc $\Delta$ G6PDH* (coluna 1) obtida na cromatografia. Gel (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) revelado com sistema de detecção Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa.

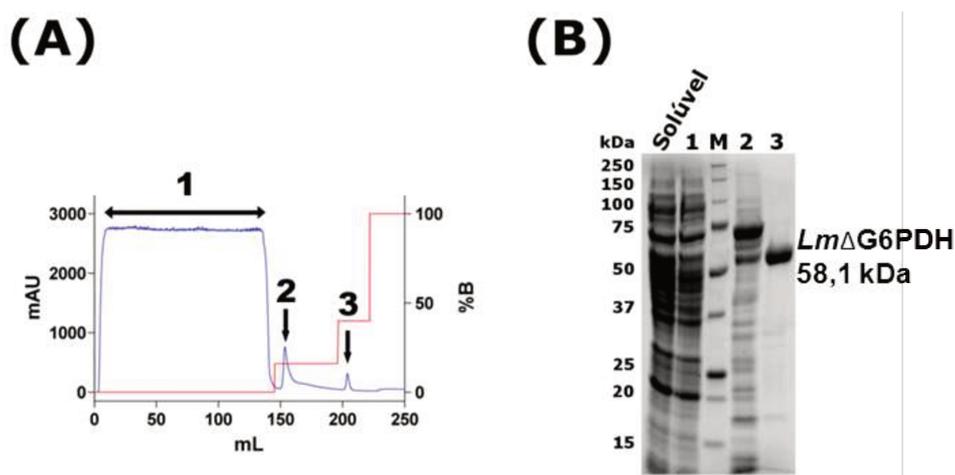
Como serão apresentados nas próximas seções, os parâmetros cinéticos da *Tc $\Delta$ G6PDH* foram determinados por cinética do estado estacionário. Para comparar a atividade das formas truncada e longa da enzima, a *TcG6PDH* foi produzida usando o mesmo sistema de expressão empregado na obtenção *Tc $\Delta$ G6PDH*. A quantidade e o grau de pureza da *TcG6PDH* obtida em um passo único de purificação por cromatografia de afinidade foram considerados satisfatórios para realização dos ensaios planejados (Figura 6.4).



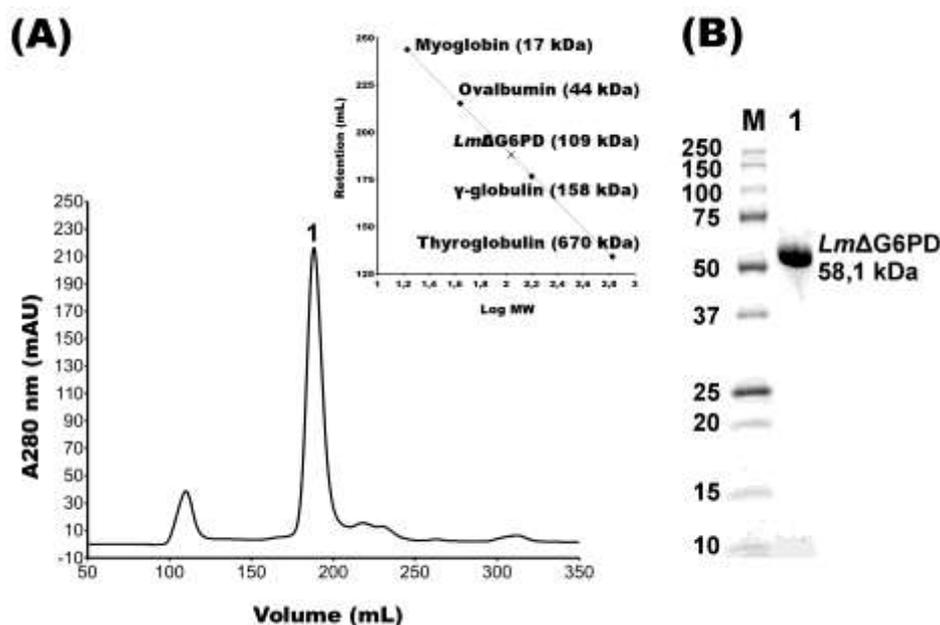
**Figura 6.4** – SDS-PAGE da amostra de *TcG6PDH* (coluna 1) obtida na cromatografia de afinidade. Gel (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) revelado com sistema de detecção Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa.

### 6.3 – Produção e Purificação da *Lm*ΔG6PDH

Similar ao observado para a forma truncada da G6PDH de *T. cruzi*, a *Lm*ΔG6PDH obtida na cromatografia de afinidade apresentava alto grau de pureza (Figura 6.5). Uma amostra homogênea de dímeros da *Lm*ΔG6PDH era obtida na cromatografia de exclusão molecular (Figura 6.6)



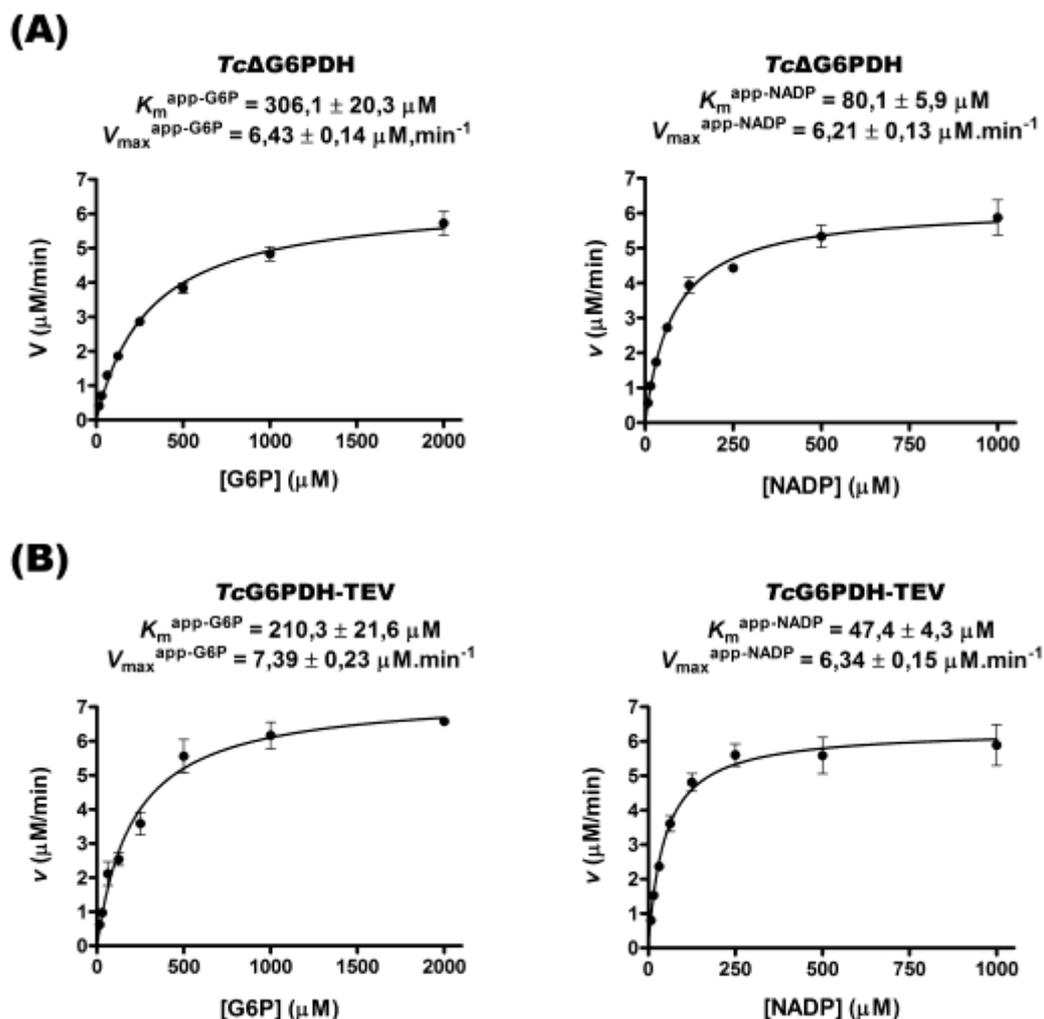
**Figura 6.5** – Cromatografia de afinidade da *Lm*ΔG6PDH. **A)** Cromatograma mostrando a absorbância no UV e a porcentagem do tampão B2, usado para gerar um gradiente de imidazol. Setas no cromatograma indicam as frações usadas no SDS-PAGE, numeradas de acordo com as colunas do gel. **B)** Gel de poliacrilamida (Mini-PROTEAN TGX Stain Free, BIORAD) mostrando que a *Lm*ΔG6PDH (coluna 5) eluída com 200 mM imidazol apresenta alto grau de pureza. Proteínas reveladas com sistema Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massa molecular.



**Figura 6.6** – Cromatografia de exclusão molecular da *LmΔG6PDH* e análise da estrutura quaternária. **A)** Cromatograma de eluição isocrática mostra que uma amostra homogênea da proteína elui com uma estrutura quaternária correspondente a um dímero (gráfico do canto superior direito). **B)** SDS-PAGE da amostra da *LmΔG6PDH* (coluna 1) obtida na cromatografia. Gel Mini-PROTEAN TGX Stain Free (BIORAD) revelado com sistema de detecção Gel Doc EZ (BIORAD). Coluna M, marcador de massas em kDa.

#### 6.4 – Atividade Catalítica *TcΔG6PDH* e *TcG6PDH-TEV*

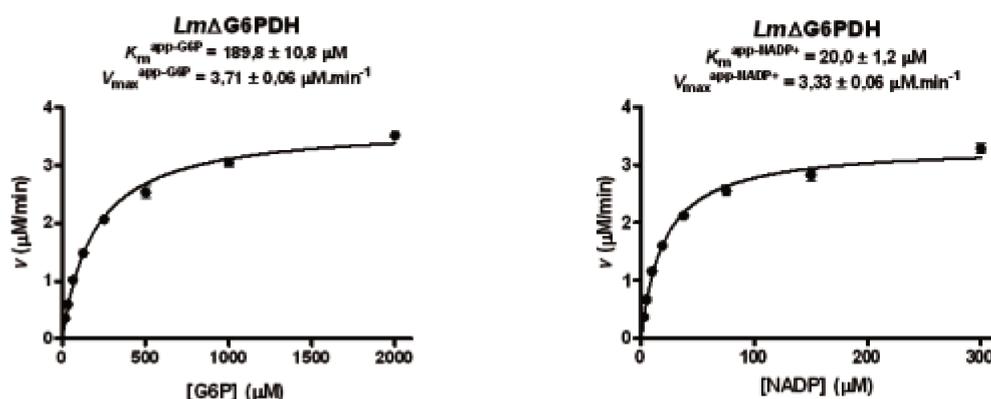
Nos ensaios enzimáticos realizados com a *TcΔG6PDH*, a adição de glicerol e NaCl ao tampão de reação eram essenciais para manter a enzima ativa. Esses aditivos são classicamente usados para aumentar a solubilidade de proteínas em solução, muito provavelmente atuando via estabilização de cargas e interações hidrofóbicas. Deste modo, o efeito do NaCl e glicerol sobre a *TcΔG6PDH* são provavelmente resultado do aumento da solubilidade da enzima. Nestas condições experimentais, o  $K_m^{app}$  para G6P e  $NADP^+$  foram  $306,1 \pm 20,3$  e  $80,1 \pm 5,9$   $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 6.7-A). Usando esta mesma condição de ensaio, os valores de  $K_m^{app}$  obtidos com *TcG6PDH-TEV* foram  $210,3 \pm 21,6$  e  $47,4 \pm 4,3$   $\mu\text{M}$  para G6P e  $NADP^+$ , respectivamente (Figura 6.7-B). Apesar de levar a uma pequena diminuição na afinidade do substrato e cofator, a remoção dos 67 resíduos de aminoácidos da *TcG6PDH* gera uma forma truncada da enzima que é funcional e poderia ser empregada nos ensaios de cristalização.



**Figura 6.7** – Gráficos de Michaelis-Menten para G6P e NADP<sup>+</sup>. **A)**  $K_m^{\text{app}}$  e  $V_{\text{max}}^{\text{app}}$  obtidos para TcΔG6PDH. **B)**  $K_m^{\text{app}}$  e  $V_{\text{max}}^{\text{app}}$  observados para a TcG6PDH-TEV.

### 6.5 – Atividade Catalítica da *Lm*ΔG6PDH e *Lm*G6PDH

O  $K_m^{\text{app}}$  do G6P e do NADP<sup>+</sup> obtidos para a *Lm*ΔG6PDH (Figura 6.8) são aproximadamente 4 e 2,6 vezes maior do que o valor observado para a forma longa da enzima (Figura 4.3), respectivamente. Apesar de apresentar uma afinidade reduzida pelo substrato e cofator quando comparada a enzima nativa, a G6PDH de *L. mexicana* truncada se mostrou estável e funcional, sendo considerada apta para realização dos ensaios de cristalização.



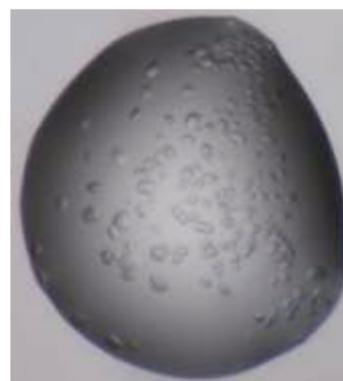
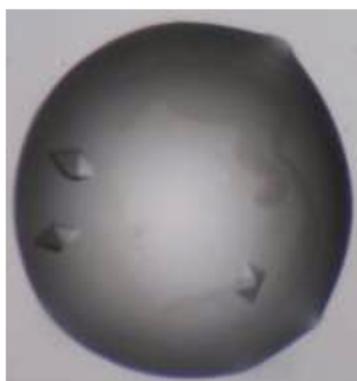
**Figura 6.8** – Gráficos de Michaelis-Menten do G6P e NADP<sup>+</sup> para a *LmΔG6PDH*. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  aparentes estão representados na figura.

## 6.6 – Ensaios de Cristalização das G6PDHs Truncadas

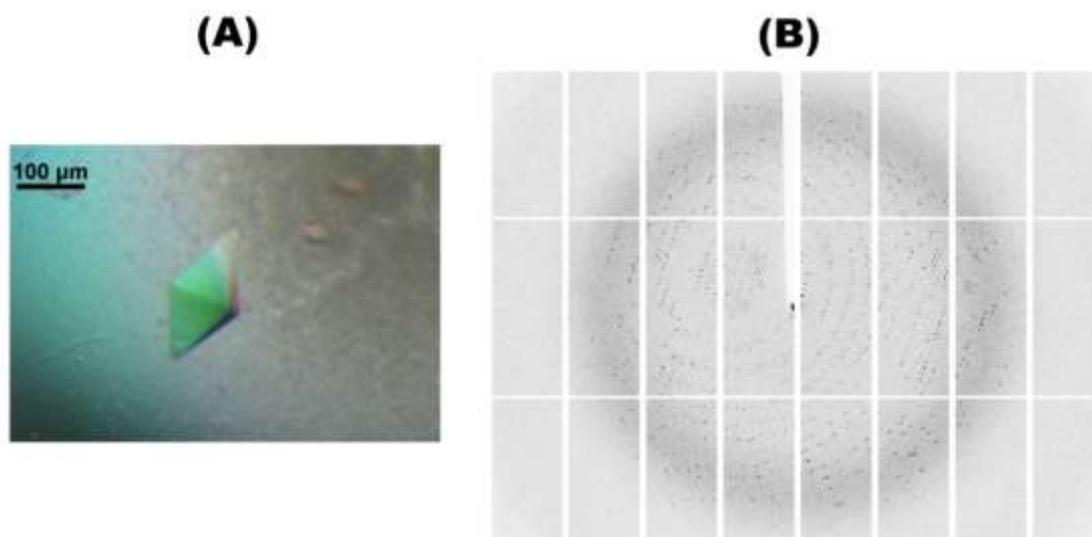
Nas triagens feitas com a *LmΔG6PDH* usando os kits de cristalização comerciais (Classics Suite, PGA e JCSG plus) não foram obtidos cristais da proteína. No caso da *TcΔG6PDH*, cristais obtidos na condição G1 do kit JCSG-plus (Figura 6.9) foram otimizados de modo a se obter cristais apropriados para experimentos de difração de raios-X (Figura 6.10). Cristais bipiramidais da *TcΔG6PDH* obtidos na presença de G6P e NADPH cresciam a uma dimensão máxima de 0,3 mm em aproximadamente 15 dias e difratavam a uma resolução máxima de 2,65 Å usando radiação síncrotron.

<b>Proteína</b>	<i>TcΔG6PDH</i> 10 mg.ml <sup>-1</sup>	<i>TcΔG6PDH</i> 10 mg.ml <sup>-1</sup>
<b>Ligante</b>	2 mM NADP <sup>+</sup>	2 mM G6P + 2 mM NADPH
<b>Tampão</b>	20 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,2 M NaCl	20 mM Tris-HCl pH 8,0 + 0,2 M NaCl

**Cristais**



**Figura 6.9** – Cristais obtidos na triagem inicial da *TcΔG6PDH*. Fotos do poço G1 do kit JCSG plus, contendo 30 % jeffamina ED-2003 e 0,1 M HEPES pH 7,0.



**Figura 6.10** – Cristalização da *TcΔG6PDH* e padrão de difração de raios-X. **A)** Típico cristal da enzima truncada, obtido misturando 2  $\mu\text{L}$  da solução de proteína ( $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  *TcΔG6PDH*, 5 mM de G6P, 2 mM NADPH, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 M NaCl, 5 mM  $\beta$ -ME) com 1  $\mu\text{L}$  da precipitante (27-32 % de jeffamina ED-2003, 0,1 M HEPES pH 6,8-7,2). **B)** Padrão de difração da *TcΔG6PDH* obtido na linha I04 do Diamond usando detector do tipo Pilatus 2M.

### 6.7 – Estrutura da G6PDH de *T. cruzi*

Dados de difração coletados na linha I04 do Diamond foram indexadas e os dados integrados com o programa XDS, para então ser escalonados com o programa AIMLESS. As estatísticas obtidas no processamento do conjunto de dados da *TcΔG6PDH* são apresentadas na tabela 6.1.

Os cálculos de substituição molecular posicionaram três cadeias polipeptídicas na unidade assimétrica (U.A.), nomeadas A, B e C. Durante o refinamento no espaço real observou-se densidade eletrônica para os resíduos Pro62 a Tyr545, bem como uma molécula de G6P e uma de NADPH, para todas as cadeias polipeptídicas presentes na U.A. A estrutura da G6PDH de *T. cruzi* é o primeiro complexo ternário obtido para enzimas homólogas de eucariotos. Duas alças expostas para o solvente, cobrindo da Arg129-His136 e Ala290-Y295, foram mantidas no modelo final apesar de serem pouco ordenadas. Essas alças não estavam envolvidas em contatos cristalinos ou interação com ligantes.

**Tabela 6.1** – Estatísticas cristalográficas do complexo ternário da TcΔG6PDH-G6P-NADPH. Modelo final depositado no PDB sob o código 5AQ1.

<b>Coleta de Dados e Processamento</b>	
Número de Imagens e $\Delta\phi$	2.000, 0,1°
Faixa de Resolução (Å)	49,13-2,65 (2,72-2,65)
Grupo Espacial	$I4_122$
Parâmetro de Cella (Å, °)	a = b = 154,95, c = 348,36 $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Comprimento de Onda (Å)	0,91741
Número de Reflexões Totais	508422 (39534)
Número de Reflexões Únicas	58510 (4584)
$R_{\text{merge}}^\dagger$ (%)	12,9 (83,5)
Completeza (%)	95,4 (96,9)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	11,1 (2,5)
Multiplicidade	8,7 (8,6)
Teor de Solvente (%)	60
Subunidades por unidade assimétrica	3
Fator de temperatura (Å <sup>2</sup> )	39,6
<b>Refinamento</b>	
$R_{\text{work}}^\S$ (%)	19,99
$R_{\text{free}}^\P$ (%)	22,55
R.m.s.d., ligações (Å)	0,0048
R.m.s.d., ângulos (°)	1,0476
Resíduos de aminoácido	1458
Número de átomos de proteína	11571
Número de átomos de solvente	253
Fator de temperatura médio (Å <sup>2</sup> )	
Proteína – Cadeias A / B / C	43,0 / 46,9 / 54,2
BG6 – Cadeia A / B / C	29,2 / 32,7 / 37,1
NDP – Cadeia A / B / C	51,8 / 53,5 / 67,4
Águas	34,1

<sup>a</sup> - Valores em parenteses são referentes a faixa de resolução mais alta (2,72 a 2,65 Å).

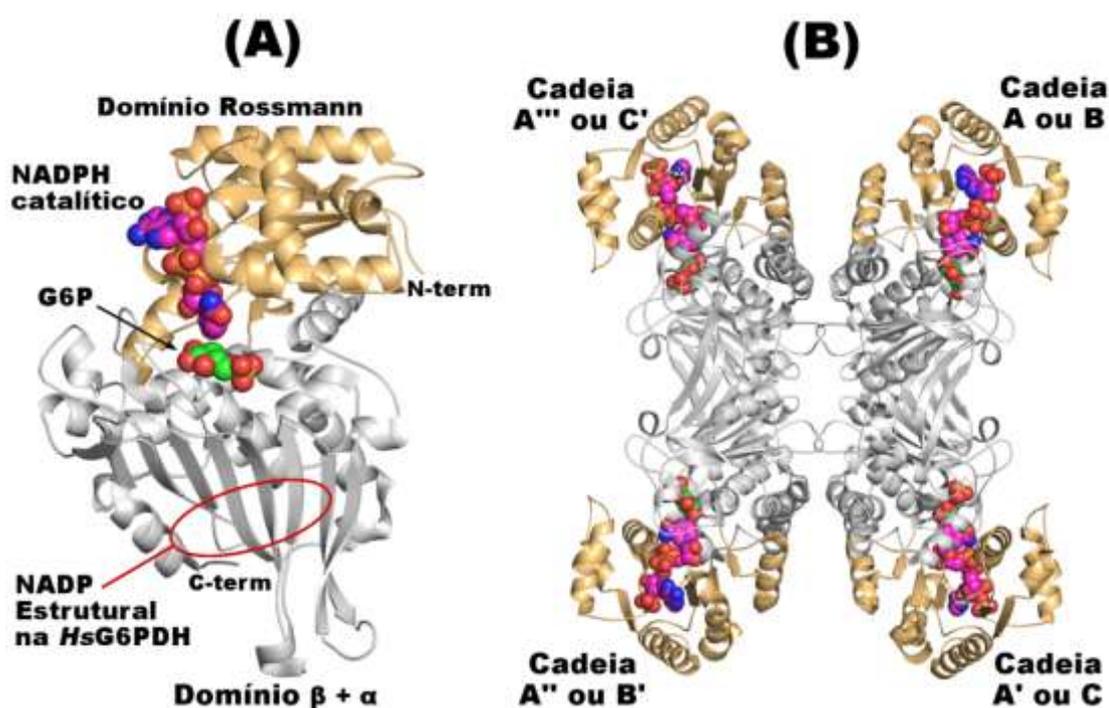
<sup>†</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$ , aonde  $I_i(hkl)$  é a intensidade da medida  $i$  da reflexão  $hkl$  e  $\langle I(hkl) \rangle$  é o valor médio de  $I_i(hkl)$  para todas as medidas  $i$ .

<sup>§</sup>  $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| | / \sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|$ , aonde  $F_{\text{obs}}$  é a amplitude do fator de estrutura observada e  $F_{\text{calc}}$  é a amplitude do fator de estrutura calculada para o modelo.

<sup>¶</sup>  $R_{\text{free}}$  é o mesmo que  $R_{\text{work}}$  exceto que este é calculado com um subconjunto (5%) dos dados que foi excluído do refinamento.

A análise de *Ramachandran* da estrutura da *Tc*ΔG6PDH, feita usando MOLPROBITY,<sup>100</sup> não mostrou resíduos em regiões proibidas, sendo que 98% dos resíduos estavam em regiões favoráveis e 2% em regiões permitidas. A sobreposição das cadeias A, B e C usando o esqueleto C<sup>α</sup> mostra que essas cadeias são praticamente idênticas, retornando um valor de RMSD de 0,10 Å (434 átomos C<sup>α</sup>), 0,23 Å (445 átomos C<sup>α</sup>) e 0,17 Å (448 átomos C<sup>α</sup>) ao se alinhar as cadeias AB, AC e BC, respectivamente.

A *Tc*ΔG6PDH apresenta uma topologia similar a das enzimas homólogas de bactéria e humanos,<sup>81,85</sup> sendo composta de um domínio do tipo Rossmann (resíduos Pro62 a Ile245) e um domínio β + α (resíduos Aso246 a Thr545) (Figura 6.11-A). O domínio Rossmann possui 6 folhas-β centrais cercadas por 3 α-hélices de cada lado. Já o domínio β + α possui uma extensa folha-β formada por nove fitas antiparalelas, que na *Hs*G6PDH formam sítio de ligação do NADP<sup>+</sup> estrutural. Na estrutura da *Tc*ΔG6PDH não há densidade eletrônica para suportar a presença de um NADP<sup>+</sup> estrutural.

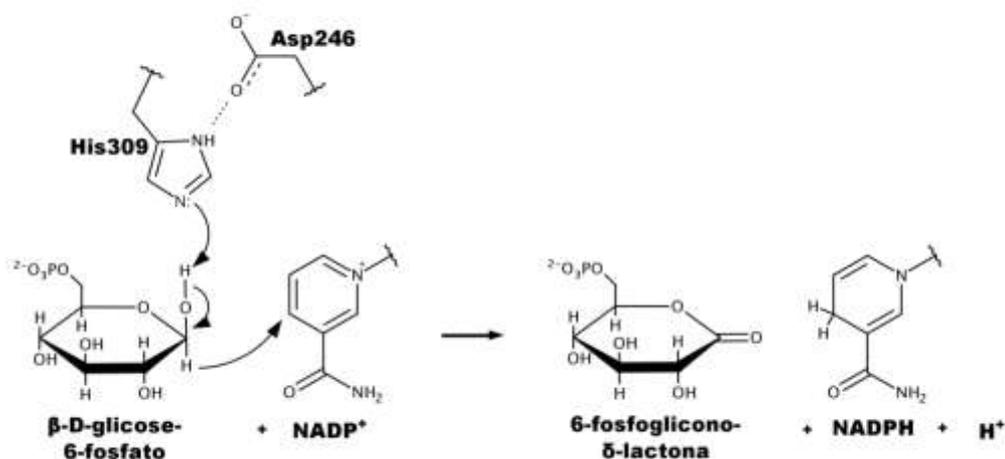


**Figura 6.11** – Representação na forma de fitas e esferas da *Tc*ΔG6PDH e seus ligantes. **A)** Estrutura de uma subunidade, mostrando o domínio Rossmann N-terminal (laranja), domínio β + α C-terminal (cinza), NADPH (esferas magenta) e o G6P (esferas verdes). O sítio do NADP<sup>+</sup> estrutural na *Hs*G6PDH está indicado (elipse vermelha). **B)** Unidade biológica da *Tc*ΔG6PDH: resíduos da interface do tetrâmero são exclusivamente localizados no domínio β + α. Dois tetrâmeros únicos podem ser gerados a partir das subunidades da *Tc*ΔG6PDH, um com a cadeia A e vizinhos relacionados por simetria (A', A'' e A''') e outro usando o dímero formado pelas cadeias B e C e um dímero relacionado por simetria (B' e C').

Embora existam três cadeias polipeptídicas na U.A. dos cristais da *Tc*ΔG6PDH, a unidade biológica esperada pode ser reconstruída por operações de simetria cristalográfica. Assim, o tetrâmero da *Tc*ΔG6PDH pode ser formado pela união de dois dímeros das cadeias B:C o por quatro cadeias A (Figura 6.11-B). Não há diferenças significativas entre esses dois tetrâmeros, sendo que em ambos, os contatos entre as cadeias para forma a unidade biológica são estabelecidos exclusivamente por resíduos do domínio  $\beta + \alpha$ . Cerca de 12 % da área superficial de cada subunidade (equivalente a uma área de aproximadamente 3250 Å<sup>2</sup>) que forma o tetrâmero esta envolvida no contato inter-cadeias.

## 6.8 – Sítio de Ligação do G6P

A G6PDH catalisa a oxidação do G6P para produzir 6-fosfoglicono- $\delta$ -lactona, que possui uma ligação dupla entre o C1 e O1, com concomitante redução do NADP<sup>+</sup> pela transferência de um íon hidreto para o C4 da nicotinamida (Figura 6.12).



**Figura 6.12** – Esquema da reação catalisada pela G6PDH. Na *Tc*G6PDH, o átomo N<sup>δ1</sup> da His309 faz uma ligação de hidrogênio com o O<sup>δ1</sup> do Asp246, formando o par catalítico da enzima. O átomo N<sup>ε2</sup> da His309 atua como base que abstrai o próton da hidroxila do C1 do G6P, induzindo a transferência do hidreto do C1 para o C4 do motivo nicotinamida do NADP<sup>+</sup>. Como produto da reação, são formados 6-fosfoglicono- $\delta$ -lactona e NADPH. Apenas o grupo nicotinamida do NADP(H) está representado na ilustração.

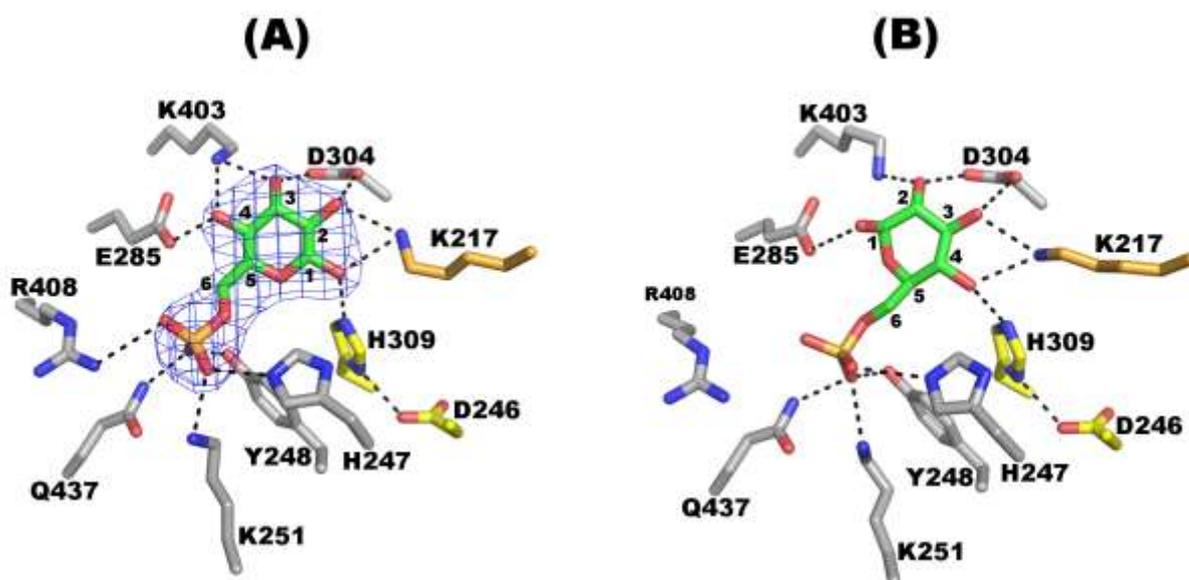
Na estrutura da *Tc*ΔG6PDH, o anômero-β de G6P se encontra em uma conformação cadeira  ${}^4C_1$  e forma ligações de hidrogênio com as cadeias laterais de 11 resíduos de aminoácidos (Tabela 6.2). Esses resíduos são altamente conservados nas enzimas de humanos e da bactéria *L. mesenteroides*.<sup>83,86</sup> A conformação adotada pelo G6P na *Tc*ΔG6PDH orienta a hidroxila do C1 na direção do  $N^{\epsilon 2}$  da His309. Além disso, o  $N^{\delta 1}$  da His309 forma uma ligação de hidrogênio com o  $O^{\delta 1}$  do Asp246. Essas interações estão de acordo com o mecanismo de reação postulado para a G6PDH,<sup>83,84</sup> onde o par catalítico, representado pela His 309 e Asp246 na *Tc*ΔG6PDH, é responsável pela abstração do próton no substrato (Figura 6.12 e Figura 6.13-A).

**Tabela 6.2** – Ligações de hidrogênio formadas pelo G6P com resíduos da *Tc*ΔG6PDH (PDB 5AQ1). As distâncias reportadas referem-se à cadeia A.

Glicose-6-fosfato (G6P)		<i>Tc</i> ΔG6PDH		Distância (Å)
Átomo	Resíduo	Átomo		
O1	K217	$N^{\zeta}$		3,3
O1	H309	$N^{\epsilon 2}$		2,8
O2	K217	$N^{\zeta}$		3,1
O2	D304	$O^{\delta 1}$		2,6
O3	D304	$O^{\delta 2}$		2,5
O3	K403	$N^{\zeta}$		2,8
O4	E285	$O^{\epsilon 2}$		2,5
O4	K403	$N^{\zeta}$		3,0
O1 – PO <sub>4</sub>	Y248	$O^{\eta 1}$		2,7
O1 – PO <sub>4</sub>	Q437	$N^{\epsilon 2}$		2,9
O2 – PO <sub>4</sub>	H247	$N^{\epsilon 2}$		2,6
O2 – PO <sub>4</sub>	K251	$N^{\zeta}$		2,9
O3 – PO <sub>4</sub>	R408	$N^{\eta 2}$		3,5

A comparação entre o complexo ternário *Tc*ΔG6PDH-G6P-NADPH e o complexo binário *Tc*G6PDH-G6P (PDB 4EM5, Buschiazzo, A.; Botti, H.; Ortiz, C.; Comini, M.A.) revela uma conformação inesperada para o G6P. No complexo binário existem quatro cadeias polipeptídicas na U.A. e em três delas o anel piranose do G6P está invertido, com a hidroxila do C4 orientada para o  $N^{\epsilon 2}$  His309 (Figura 6.13-B). Esse posicionamento do G6P, que não é compatível com o mecanismo de reação proposto, pode ser observado nas cadeias A, B e C.

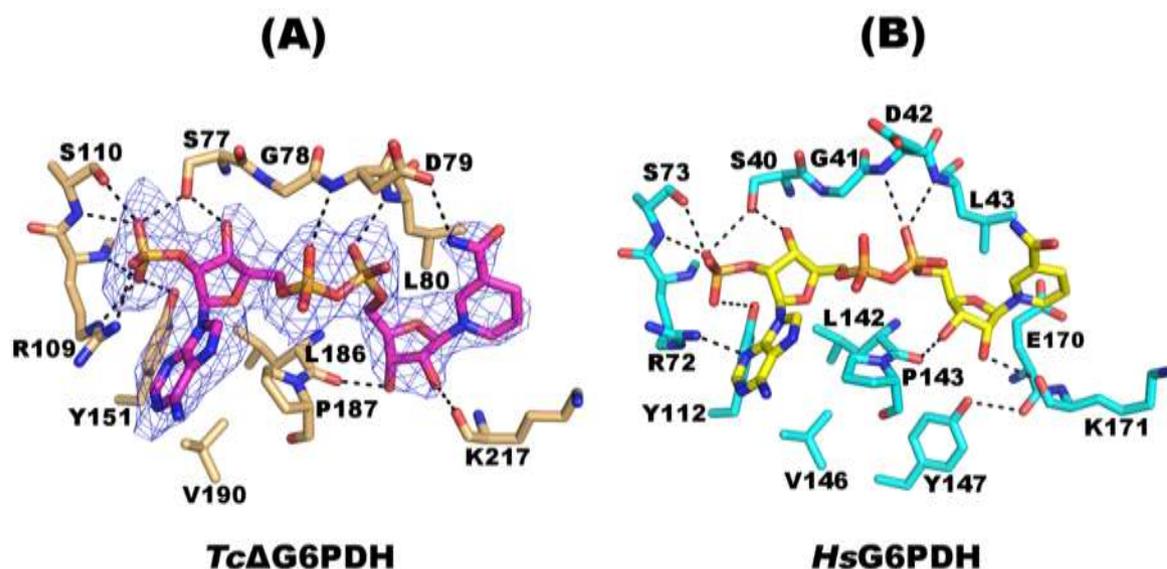
Na cadeia D, o G6P está na orientação esperada, com a hidroxila do C1 apontando para a His309. A baixa resolução do complexo binário (3,35 Å) pode ter dificultado a interpretação da densidade eletrônica do substrato e neste sentido nós fomos favorecidos pela obtenção de dados de difração a uma melhor resolução, permitindo a obtenção de um modelo mais preciso e confiável.



**Figura 6.13** – Sítio de ligação do G6P na enzima G6PDH de *Trypanosoma cruzi*. **A)** Orientação do substrato na estrutura do complexo ternário (PDB 5AQ1) obtido pelo nosso grupo. Mapa *F<sub>o</sub>-F<sub>c</sub>* do G6P contornado a 3,8 σ. As linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio. **B)** Orientação do substrato na estrutura do complexo binário (PDB 4EM5), com a piranose em uma conformação não compatível com o mecanismo de reação. A His309 e Asp246 (bastões amarelos) formam o par catalítico responsável pela abstração do próton da hidroxila do C1 do G6P. Os resíduos em cinza e amarelo pertencem ao domínio β + α, enquanto a Lys217 (bastão laranja) pertence do domínio Rossmann. As figuras foram preparadas usando a cadeia A de ambas as estruturas.

## 6.9 – Sítio de Ligação do NADP(H) Catalítico

Na estrutura da *Tc*ΔG6PDH, observa-se uma molécula de NADPH ocupando o sítio do cofator no domínio Rossmann (Figura 6.14-A). O cofator forma ligações de hidrogênio com 8 resíduos de aminoácido distintos (Tabela 6.3), além de uma interação do tipo cátion-π envolvendo seu motivo adenina e a Arg109.

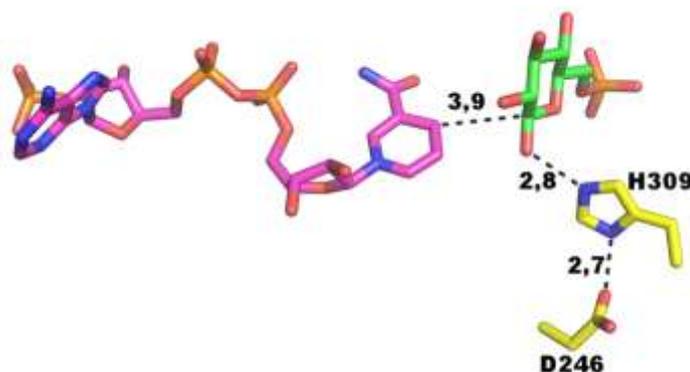


**Figura 6.14** – Comparação entre o sítio de ligação do NADP(H) catalítico da *TcΔG6PDH* (cadeia A; PDB 5AQ1) e *HsG6PDH* (cadeia A; PDB 2BH9). **A)** Resíduos da *TcΔG6PDH* (laranja claro) fazendo ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) com o NADPH catalítico (magenta). Mapa *Fo-Fc* do NADPH representado com  $\sigma$  igual a 2,5. **B)** Resíduos da *HsG6PDH* (azul claro) fazendo interações de hidrogênio (linhas tracejadas) com o NADP<sup>+</sup> catalítico (amarelo).

**Tabela 6.3** – Ligações de hidrogênio formadas pelo NADPH com resíduos da *TcΔG6PDH* (PDB 5AQ1). Distâncias reportadas são referentes à cadeia A.

Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida (NADPH)	<i>TcΔG6PDH</i>		Distância (Å)
	Resíduo	Átomo	
O1 – 2' PO <sub>4</sub>	R109	N <sup>n2</sup>	3,0
O2 – 2' PO <sub>4</sub>	S77	O <sup>y</sup>	2,6
O2 – 2' PO <sub>4</sub>	S110	N	3,1
O2 – 2' PO <sub>4</sub>	S110	O <sup>y</sup>	2,7
O3 – 2' PO <sub>4</sub>	R109	N <sup>e</sup>	3,0
O3 – 2' PO <sub>4</sub>	R109	N	3,0
O3 – 2' PO <sub>4</sub>	Y151	O <sup>n1</sup>	2,7
O3 – Ribose da Adenina	S77	O <sup>y</sup>	2,9
O2A – Difosfato	D79	N	3,4
O1N – Difosfato	L80	N	2,9
O2 – Ribose da Nicotinamida	K217	O	2,7
O3 – Ribose da Nicotinamida	L186	O	2,6
N7N – Nicotinamida	D79	O <sup>δ</sup>	3,4

Conforme mencionado anteriormente, a reação de catálise postulada para a G6PDH envolve a abstração do próton do G6P pelo par catalítico His/Asp seguido da transferência de um hidreto para o C4 do motivo nicotinamida do NADP<sup>+</sup>. No complexo ternário da *Tc*ΔG6PDH o grupo nicotinamida do cofator se apresenta em uma conformação *syn*, acomodando seu C4 a uma distância de 3,9 Å do C1 do G6P (Figura 6.15). Assim, proximidade do C4 da nicotinamida e o C1 do G6P é compatível com o mecanismo de reação.



**Figura 6.15** – Representação na forma de bastões do NADPH (magenta), G6P (verde) e do par catalítico (amarelo) da estrutura da *Tc*ΔG6PDH. As distâncias entre os átomos envolvidos na reação de catálise estão mostradas em angstroms (Å). Figura preparada usando a cadeia A da enzima (PDB 5AQ1).

Todos os resíduos envolvidos na ligação do NADP(H) catalítico são conservados nas estruturas da *Tc*ΔG6PDH e *Hs*G6PDH, com uma marcante exceção. Na enzima humana, o átomo O<sup>n</sup> da Tyr147 doa seu hidrogênio para o grupo carbonila da cadeia principal do Glu170, formando uma ligação de hidrogênio (Figura 6.14-B). Na *Tc*ΔG6PDH a Tyr147 é naturalmente substituída pela Phe191, que apresenta uma rotação no ângulo  $\chi_1$  de aproximadamente 120° e passa a estabelecer uma interação com a Cys195 (Figura 6.16-A). Apesar de interações entre cadeias laterais de aminoácidos aromáticos com outro contendo enxofre não ser abundante, esse tipo de interação usualmente envolve resíduos de  $\alpha$ -hélices (*i* e *i*+4) contribuindo para aumento da estabilidade deste tipo de elemento estrutural.<sup>119,121</sup> O par Phe-Cys é altamente conservado nas G6PDHs de tripanosomatídeos, mas não nas enzimas homólogas de bactéria. Por exemplo, nas G6PDHs de *M. avium* e *L. mesenteroides* (códigos PDB 4LGV e 1DPG, respectivamente) a cisteína é substituída por uma valina ou alanina, respectivamente, fazendo com que a fenilalanina (equivalente a Phe191 na *Tc*ΔG6PDH) adote o mesmo rotâmero observado para a Tyr147 da *Hs*G6PDH. A distinta orientação da Phe191 na *Tc*ΔG6PDH, possivelmente permitida pela perda de uma ligação de hidrogênio restritiva e a

formação de uma interação Phe-Cys, leva a formação de uma cavidade abaixo da ribose da nicotinamida na *Tc*ΔG6PDH (Figura 6.17). Notoriamente, essa cavidade não existe na *Hs*G6PDH por conta da distinta orientação da Tyr147 (Figura 6.16-B) e também não foi encontrada em outras proteínas humanas que, de acordo com a base de dados CATH,<sup>120</sup> também possuem um domínio do tipo Rossmann capaz de ligar NADP(H). As estruturas das proteínas inspecionadas estão listadas na Tabela 6.5.

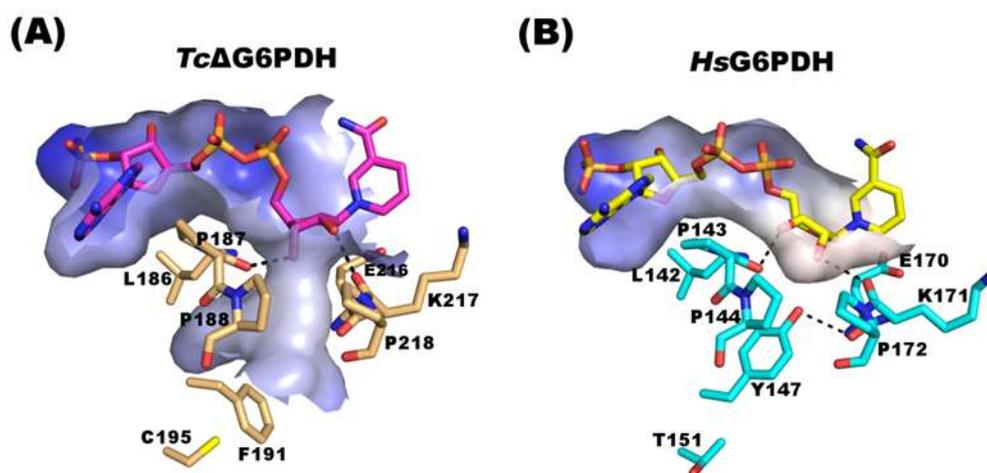
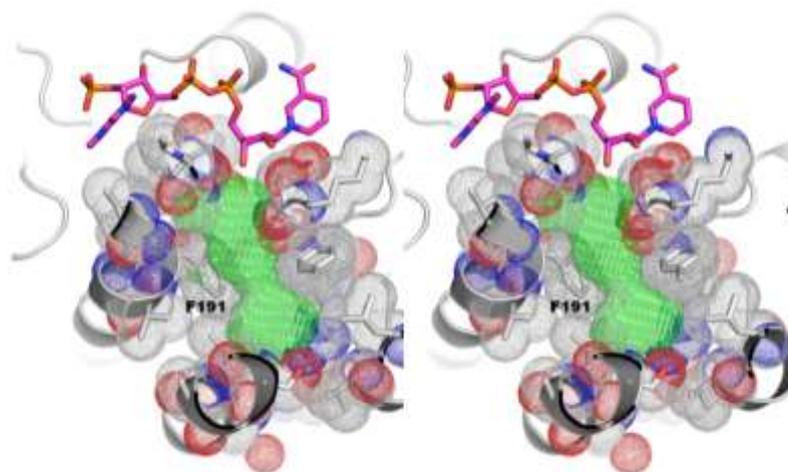


Figura 6.16 – Vizinhança do sítio do NADP(H) catalítico na G6PDH humana e de *T. cruzi*. A comparação entre a *Tc*ΔG6PDH (A) e *Hs*G6PDH (B) mostra a entrada da cavidade acessória na enzima do parasito, próximo à ribose da nicotinamida, que não é observada na enzima humana.

Usando o software KVFinder,<sup>104</sup> o volume da cavidade encontrada abaixo do NADP(H) catalítico na *Tc*ΔG6PDH foi estimado em aproximadamente 220 Å<sup>3</sup>. Com esse volume, essa cavidade seria capaz de acomodar, por exemplo, substituintes cíclicos ligados a ribose da nicotinamida (Figura 6.17). Além disso, os átomos que formam a parede desta cavidade são majoritariamente hidrofóbicos (Tabela 6.4). Desta forma, a cavidade na enzima de *T. cruzi* abre novas oportunidades para o desenho baseado em estrutura de inibidores competitivos da G6PDH. Como essa característica estrutural representa uma diferença com relação a enzima humana, é possível que inibidores desenvolvidos para ocupar ao mesmo tempo o sítio do NADP(H) e a cavidade identificada na G6PDH de *T. cruzi* sejam altamente seletivos.



**Figura 6.17** – Diagrama estéreo da mostrando uma secção da cavidade encontrada no domínio Rossmann da *TcΔG6PDH*. Os resíduos que definem a cavidade são majoritariamente hidrofóbicos (Tabela 6.4). As esferas verdes foram adicionadas pelo software KVFinder e usadas para estimar o volume da cavidade (aproximadamente 220 Å<sup>3</sup>).

**Tabela 6.4** - Resíduos e átomos formando a parede da cavidade vizinha ao sítio do NADP(H) catalítico na *TcΔG6PDH*. Os valores em parênteses correspondem à área (Å<sup>2</sup>) da superfície acessível ao solvente (SAS) do átomo, calculada com o programa AREAIMOL disponível no pacote CCP4.

Resíduo	Átomos da Cadeia Principal		Átomos da Cadeia Lateral	
	Apolar	Polar	Apolar	Polar
L184		O (2.8)	C <sup>β</sup> (1.3), C <sup>δ</sup> (0.3)	
L186		O (6.4)	C <sup>β</sup> (2.5), C <sup>δ1</sup> (0.5)	
P188	C (0.1)	O (0.8)	C <sup>α</sup> (0.9), C <sup>β</sup> (15.2)	
F191			C <sup>α</sup> (0.7), C <sup>β</sup> (3.4), C <sup>γ</sup> (2.9), C <sup>δ1</sup> (11.3), C <sup>δ2</sup> (1.1), C <sup>ε1</sup> (6.5), C <sup>ε2</sup> (1.0), C <sup>ε</sup> (3.2)	
V192		N (1.0)	C <sup>γ2</sup> (3.9)	
V215			C <sup>γ2</sup> (1.4)	
E216		O (9.7), N (1.7)	C <sup>β</sup> (0.2)	
P218		O (6.4), N (0.1)		
F219			C <sup>β</sup> (2.7), C <sup>δ1</sup> (10.5), C <sup>ε1</sup> (3.6)	
G220		N (2.1)		
S226		O (1.0)		O <sup>γ</sup> (3.0)
L229	C (1.4)	O (1.3)	C <sup>β</sup> (3.9), C <sup>δ2</sup> (14.7)	
S230		N (0.3)	C <sup>α</sup> (2.3)	O <sup>γ</sup> (8.1)
L233			C <sup>β</sup> (2.5), C <sup>δ1</sup> (1.8), C <sup>δ2</sup> (9.7)	
R244				N <sup>ε</sup> (6.5), N <sup>η2</sup> (4.3)
L499			C <sup>δ2</sup> (2.7)	
<b>SAS Total</b>	<b>(1.5)</b>	<b>(33.6)</b>	<b>(110.7)</b>	<b>(21.9)</b>
<b>% SAS</b>	<b>1</b>	<b>20</b>	<b>66</b>	<b>13</b>

**Tabela 6.5** – Estruturas de enzimas humanas que de acordo com a base de dados CATH possuem um domínio do tipo Rossmann capaz de ligar NADP(H). Estruturas representativas possuindo uma identidade de sequência de 70% foram recuperadas do PDB.

<b>PDB</b>	<b>Nome da Macromolécula</b>
1JTV	17- $\beta$ -hidroxi-esteróide desidrogenase tipo I
1ZBQ	17- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II
1YB1	17- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase tipo XI
1A27	17- $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase
1W6U	2,4-dienoil-CoA redutase
2I9P	3-Hidroxiisobutyrate desidrogenase
4GWG	6-Fosfogliconato desidrogenase
3GVP	Adenosil-homocisteinase 3
2O3S	ADP-ribosil ciclase I
3COS	Álcool desidrogenase IV
2FZW	Álcool desidrogenase classe III – cadeia $\chi$
1U3W	Álcool desidrogenase – Cadeia $\gamma$
1YOV	APPBP I (Proteína de ligação à proteína precursora de amilóide, tipo I)
1XG5	ARPG836
1HDO	Biliverdina IX, $\beta$ redutase
2H63	Biliverdina redutase A
1ISI	Antígeno 1 de células estromais da medula óssea
1MX3	Poteín de ligação C-terminal do tipo I
1WMA	Carbonil redutase I
1XU9	Corticosteróide 11- $\beta$ -desidrogenase
2G76	D-3-fosfoglicerate desidrogenase
3G3E	D-aminoácido oxidase
2AG5	Membro 6 da Família SDR desidrogenase/redutase
2QQ5	Membro 1 da Família SDR desidrogenase/redutase
3O4R	Membro 4 da Família SDR desidrogenase/redutase
1HDR	Diidropteridina redutase
4B4O	Proteína Sdr39U1 da Família Epimerase
2PD6	Estradiol 17- $\beta$ -desidrogenase 8
1T2A	GDP-manose 4,6-desidratase
2BH9	Glicose-6-fosfato desidrogenase
1L1F	Glutamato desidrogenase I
3H9E	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

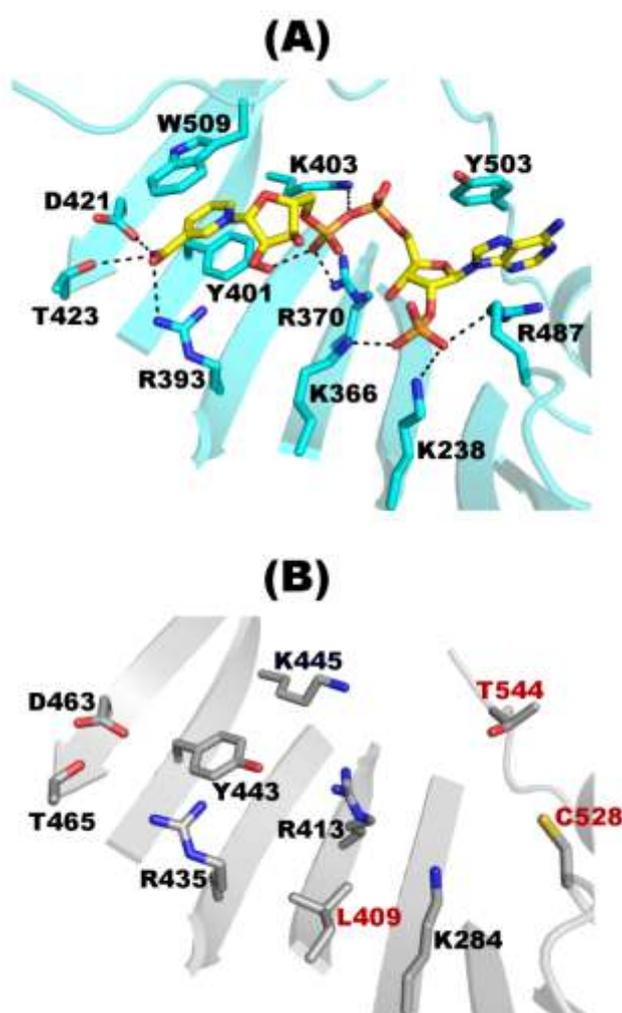
Continua...

**Tabela 6.5** – continuação...

<b>PDB</b>	<b>Nome da Macromolécula</b>
1X0V	Glicerol-3-fosfato deshydrogenase [NAD <sup>+</sup> ], citoplasmática
2O23	Proteína HADH2
1PL8	Sorbitol desidrogenase
3KVO	Proteína do tipo Hidroxiesteroide desidrogenase II
1F0Y	L-3-Hidroxiacil-CoA desidrogenase
1I0Z	L-Lactato desidrogenase
1PR9	L-Xilulose reductase
2DFD	Malate desidrogenase
2VQ3	Metaloredutase Steap3
1A4I	Metilnotetrahidrofolato desidrogenase
1ZSY	2-Enoil tioester redutase mitochondrial
2UYY	Proteína N-pac
1PJ3	Enzima málica NAD-dependente, mitochondrial
2GDZ	15-hidroxiprostaglandina desidrogenase NAD-dependente
2AW5	Enzima málica NADP-dependente
4FC7	2,4-dienoil-CoA redutase peroxissomal
1YXM	Trans 2-enoil CoA redutase peroxissomal
2Y05	Prostaglandina redutase I
2ZB4	Prostaglandina redutase II
2GRA	Pirrolina-5-carboxilato redutase I
2IZZ	Pirrolina-5-carboxilato redutase I
1YB5	Quinona oxidoredutase
1YDE	Retinal desidrogenase III
1LI4	S-adenosilhomocisteína hidrolase
1Z6Z	Sepiapterina redutase
2BKA	Proteína TIP30
1YOV	Enzima Ativadora de Ubiquitina E1C
2I6T	Enzima de conjugação de Ubiquitina tipo E2, isoforma A
1Y8Q	Enzima Ativadora de Ubiquitina E1A
1Y8Q	Enzima Ativadora de Ubiquitina E1B
1EK6	UDP-galactose 4-epimerase
2Q3E	UDP-glicose 6-desidrogenase
2B69	UDP-glicuronato descarboxilase I

## 6.10 – Sítio do NADP<sup>+</sup> Estrutural

Na *HsG6PDH* (PDB: 1QKI, 2BH9) um sítio não-catalítico para ligação de uma molécula adicional de NADP<sup>+</sup>, denominado NADP<sup>+</sup> estrutural, foi anteriormente reportado.<sup>85,86</sup> Foi postulado que esse NADP<sup>+</sup> estrutural, que se liga ao domínio  $\beta + \alpha$  no lado oposto ao G6P, é importante para a estabilidade da proteína. Na *HsG6PDH*, o NADP<sup>+</sup> estrutural participa de interações de hidrogênio com os resíduos Lys238, Lys366, Arg370, Arg393, Tyr401, Lys403, Asp421, Thr423 e Arg487 (Figura 6.18-A). Além disso, o Trp509 e a Tyr503 estabelecem interações do tipo empilhamento de elétrons- $\pi$  com os anéis nicotinamida e adenina do NADP<sup>+</sup>, respectivamente.



**Figura 6.18:** Sítio do NADP<sup>+</sup> estrutural. (A) Na *HsG6PDH* (PDB 2BH9) o NADP<sup>+</sup> estrutural (bastões amarelos) ancora no domínio  $\beta + \alpha$  através ligações de hidrogênio (linhas tracejadas) ou empilhamento de elétrons- $\pi$ . (B) A comparação com *Tc $\Delta$ G6PDH* mostra que a Lys366, Arg487 e Tyr503 da *HsG6PDH* são equivalentes a Leu409, Cys528 e Thr544 na *Tc $\Delta$ G6PDH* (destacados em vermelho), respectivamente. Essas mudanças podem comprometer a ligação do NADP<sup>+</sup> estrutural. A figura foi preparada usando a cadeia A das estruturas da enzima humana e *T. cruzi*.

A comparação entre o sítio de ligação do NADP<sup>+</sup> estrutural da *Hs*- e *Tc*Δ-G6PDH revela que a Lys366, Arg487 e Tyr503 (*Hs*G6PDH) são naturalmente substituídas pela Leu409, Cys528 e Thr544 (*Tc*ΔG6PDH), respectivamente (Figura 6.18-B). A Leu409 e Cys528 da *Tc*ΔG6PDH não seriam capazes de formar ligações de hidrogênio com fosfato-2' de um NADP<sup>+</sup> estrutural que viesse a ocupar esse sítio. Somado a isso, a Thr544 não seria capaz de estabelecer uma interação do tipo empilhamento de elétrons- $\pi$  com o motivo adenina. Além das diferenças naturais entre as G6DH de *T. cruzi* e humanos, na *Tc*ΔG6PDH a cauda C-terminal é artificialmente truncada. Na *Hs*G6PDH, a cauda C-terminal cobre o NADP<sup>+</sup> estrutural fornecendo um resíduo aromático (Trp509) que empilha com o motivo adenina. Essas mudanças podem comprometer a ligação do NADP<sup>+</sup> estrutural na *Tc*ΔG6PDH e explicar o porque este não foi observado na estrutura. Notavelmente, nos ensaios enzimáticos realizados com as *Tc*ΔG6PDH observou-se que NaCl e glicerol, reagentes conhecidos por aumentar a estabilidade de proteínas, são necessários para manter a proteína solúvel e conseqüentemente ativa.

# Capítulo 7

## *Conclusões e Perspectivas*

## 7 – Conclusões e Perspectivas

Nesta tese de doutorado foram apresentados os resultados obtidos com os estudos das enzimas G6PDH de *T. cruzi* e *L. mexicana*, desenvolvidos no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e na Universidade de Dundee (*School of Life Sciences, University of Dundee, UK*).

Uma campanha de triagem biológica automatizada em larga escala (HTS) foi executada com a *TcG6PDH*, usando uma coleção de moléculas orgânicas com alta diversidade química. Derivados de quinazolinonas e tienopirimidinas com valores  $IC_{50}$  abaixo de 10  $\mu\text{M}$  foram identificados e revelaram atuar por um mecanismo de inibição incompetitivo. REA preliminares foram obtidas tanto para as tienopirimidinas quanto para as quinazolinonas, permitindo o estabelecimento de duas novas séries de hits para a *TcG6PDH*. Em ambas classes químicas foram encontradas moléculas que apresentavam uma seletividade sem precedentes para G6PDH de *T. cruzi*, uma vez que os mais potentes inibidores de G6PDH conhecidos até então eram pregnanas e/ou androstanas capazes de inibir tanto a enzima de parasitas como a de humanos. Esses resultados abrem a possibilidade de se expandir as séries de derivados de quinazolinonas (especialmente aqueles carregando motivo piperazina) e tienopirimidinas. O desenvolvimento de moléculas seletivas ainda mais potentes será importante para avaliar a eficácia e a toxicidade dos inibidores da *TcG6PDH* em modelos experimentais *in vitro*.

Contrário às G6PDHs de *Trypanosoma*, a *LmG6PDH* não é inibida por derivados de DHEA, o que colocava em dúvida a existência de um sítio para interação de inibidores incompetitivos na enzima de *Leishmania*. Ensaio enzimático com os hits encontrados para a *TcG6PDH* revelaram que derivados de quinazolinonas também são capazes de inibir a *LmG6PDH*. As moléculas mais potentes apresentaram valores de  $IC_{50}$  próximos de 12  $\mu\text{M}$ , mas apesar de apresentarem uma potencia reduzida com relação a *TcG6PDH*, a demonstração de que as quinazolinonas inibem a *LmG6PDH* por mecanismo incompetitivo confirma a existência nesta enzima de um sítio para interação de inibidores incompetitivos. Como ainda não existe um corpo de evidências que demonstrem que a G6PDH é essencial para a sobrevivência ou multiplicação de *Leishmania* spp, os derivados de quinazolinona surgem como potenciais sondas químicas para avaliar se em ensaios *in vitro* a inibição da *LmG6PDH* afetaria o crescimento do parasita.

Anteriormente já havia sido demonstrado que os inibidores incompetitivos da G6PDH, como EA e 16BrEA, afetavam o crescimento dos parasitas *Trypanosoma brucei* (formas

tripomastigotas sanguíneas) e *T. cruzi* (formas epimastigotas). Do mesmo modo, derivados de quinazolinonas se mostraram capazes de levar a forma epimastigota do *T. cruzi* a morte em experimentos *in vitro*. O fato da G6PDH ser expressa nos quatro principais estágios biológicos do ciclo de vida do *T. cruzi* indica que a via de pentoses pode estar ativa não só nas formas epimastigota, metacíclica e tripomastigota, como também na forma amastigota. Diante da escassez de carboidratos, os tripanosomatídeos são capazes usar a via gliconeogênica para produzir de carboidratos e manter o fluxo através da via de pentoses fosfato. Como a G6PDH controla o fluxo da via de pentoses, importante para produção de NADPH e metabólitos como a ribose-5-fosfato, é provável que a inibição da G6PDH seja capaz de afetar o crescimento/desenvolvimento da forma amastigota. Assim, experimentos futuros serão executados para determinar o efeito tripanocida dos derivados de quinazolinonas contra outras formas do parasito. Vale lembrar que para a forma amastigota é importante que as moléculas não apresentem citotoxicidade para células de mamíferos e neste sentido é importante desenvolver uma série de moléculas que sejam seletivas/específica para a *TcG6PDH*.

Durante o período como estudante na *University of Dundee* (UoD), divisão *Biological Chemistry and Drug Discovery* (BCDD), nós realizamos os estudos estruturais da G6PDH de *T. cruzi* e *L. mexicana* sob orientação do Prof. Dr. Willian N. Hunter. Sistemas de produção e purificação de formas truncadas das proteínas de *T. cruzi* (*TcΔG6PDH*) e *L. mexicana* (*LmΔG6PDH*) foram estabelecidos. Tanto a *LmΔG6PDH* quanto a *TcΔG6PDH* mostraram uma afinidade reduzida pelo substrato e cofator quando comparadas com as enzimas nativas, entretanto o mais importante foi que as formas truncadas das proteínas eram funcionais. No caso da *TcΔG6PDH*, além de obter uma melhora significativa na quantidade e pureza da amostra obtida, a forma truncada ainda mostrou uma maior predisposição a formação de cristais com qualidade suficiente para se obter um conjunto de dados de difração a baixa resolução (2,65 Å). Isso permitiu a obtenção da estrutura do primeiro complexo enzima-substrato-cofator para G6PDHs de eucariotos. A comparação da estrutura da *TcΔG6PDH* com outras G6PDHs obtidas anteriormente levou a algumas observações interessantes. Primeiramente, o modelo obtido com a *TcΔG6PDH* representa o modelo mais confiável para esta enzima no que diz respeito às bases moleculares de reconhecimento do substrato e cofator. Além disso, foi identificada uma cavidade única à enzima do parasita que pode ser explorada para o desenvolvimento de inibidores. Finalmente, o complexo ternário obtido representa um avanço na tentativa de se identificar o sítio de ligação dos inibidores de G6PDH pertencentes à classe dos esteroides, quinazolinonas e/ou tienopirimidinas. Isso porque esses inibidores atuam por um mecanismo incompetitivo, o que implica que eles

devem se ligar a um complexo enzima substrato(s). A obtenção da estrutura da enzima em complexo com inibidores traria informações úteis para a otimização das moléculas tanto em termos de potência quanto seletividade de modo mais assertivo.

# Referências

## REFERÊNCIAS\*

- 1 WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3<sup>rd</sup> ed. Amsterdam: Academic Press, 2008.
- 2 HUGHES, J. P. et al. Principles of early drug discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 6, p. 1239–1249, 2011.
- 3 COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. 2<sup>nd</sup> Edition. New Jersey: Wiley, 2005.
- 4 COPELAND, R. A.; HARPEL, M. R.; TUMMINO, P. J. Targeting enzyme inhibitors in drug discovery. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 11, n. 7, p. 967–978, 2007.
- 5 ZHENG, W.; THORNE, N.; MCKEW, J. C. Phenotypic screens as a renewed approach for drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 21-22, p. 1067–1073, 2013.
- 6 GASHAW, I. et al. What makes a good drug target? **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 23-24, p. 1037–1043, 2011.
- 7 SIMEONOV, A. et al. Fluorescence Spectroscopic Profiling of Compound Libraries. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2363–2371, 2008.
- 8 MAYR, L. M.; BOJANIC, D. Novel trends in high-throughput screening. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 5, p. 580–588, 2009.
- 9 NOAH, J. W. New developments and emerging trends in high-throughput screening methods for lead compound identification. **International Journal of High Throughput Screening**, v. 1, p. 141–149, 2010.
- 10 MACARRÓN, R.; HERTZBERG, R. P. Design and implementation of high throughput screening assays. **Molecular Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 270–285, 2011.
- 11 NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.
- 12 BLUNDELL, T. L.; JHOTI, H.; ABELL, C. High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. **Nature Reviews Drug discovery**, v. 1, n. 1, p. 45–54, 2002.
- 13 HUNTER, W. N.; WEISS, M. S. Macromolecular crystallography and what it can contribute to antiparasite drug discovery. **Acta Crystallographica Section F**, v. 71, n. 5, p. 483–484, 2015.
- 14 DE VLAS, S. J. et al. Concerted Efforts to Control or Eliminate Neglected Tropical Diseases: How Much Health Will Be Gained? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004386, 2016.

---

\* Baseada na NBR-6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

- 15 LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 67–76, 2010.
- 16 CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 239–247, 2010.
- 17 HOTEZ, P. J. et al. The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2865, 2014.
- 18 FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical bulletin**, v. 93, n. 1, p. 179–200, 2010.
- 19 BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.
- 20 LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected tropical diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.
- 21 MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000 – 2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103–110, 2016.
- 22 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease**. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/chagas\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/)>. Acesso em: 11 nov. 2015.
- 23 COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, 2013.
- 24 SÁNCHEZ, L. V.; RAMÍREZ, J. D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, v. 140, n. 2, p. 147-159, 2013.
- 25 COURA, J. R. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277–282, 2015.
- 26 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Chagas disease**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/>>. Acesso em: 25 abr. 2016.
- 27 HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 15, p. 13088–13095, 2011.

- 28 HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–123, 2012.
- 29 WILKINSON, S. R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2072–2084, 2011.
- 30 MEJÍA-JARAMILLO, A. et al. Trypanosoma cruzi strains resistant to benznidazole occurring in Colombia. **Biomedica**, v. 32, n. 2, p. 196–205, 2012.
- 31 MEJIA, A. M. et al. Benznidazole-resistance in trypanosoma cruzi is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 2, p. 220–228, 2012.
- 32 CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4–S5, 2010.
- 33 CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S12–5, 2010.
- 34 BUCKNER, F. S.; URBINA, J. A. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 236–242, 2012.
- 35 BENAÏM, G.; PANIZ MONDOLFI, A. E. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, n. 10, p. 605–609, 2012.
- 36 NDAO, M. et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1167–1178, 2014.
- 37 CASTILLO, E. et al. The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 33, p. 4027–4051, 2010.
- 38 WILKINSON, S. R.; KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 11, p. e31, 2009.
- 39 PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.
- 40 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 26 abr. 2016.
- 41 CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>>. Acesso em: 26 abr. 2016.

- 42 KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.
- 43 AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- 44 DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- 45 ULLU, E.; TSCHUDI, C.; CHAKRABORTY, T. RNA interference in protozoan parasites. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 509-519, 2004.
- 46 TIELENS, A. G. M.; VAN HELLEMOND, J. J. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 10, p. 482-490, 2009.
- 47 BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1-9, 2006.
- 48 OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. **Trends in Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 149-158, 2007.
- 49 LI, Y. et al. Transcriptome Remodeling in Trypanosoma cruzi and Human Cells during Intracellular Infection. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005511, 2016.
- 50 VERLINDE, C. L. et al. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, v. 4, n. 1, p. 50–65, 2001.
- 51 BARRETT, M. P. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 13, n. 1, p. 11–16, 1997.
- 52 MAUGERI, D. A. et al. Pentose phosphate metabolism in Leishmania mexicana. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 117–125, 2003.
- 53 IGOILLO-ESTEVE, M. et al. The pentose phosphate pathway in Trypanosoma cruzi: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 649–663, 2007.
- 54 WOOD, T. Physiological functions of the pentose phosphate pathway. **Cell Biochemistry and Function**, v. 4, n. 4, p. 241–247, 1986.
- 55 MANTILLA, B. S. et al. Role of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of Trypanosoma cruzi. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 12, p. 7767–7790, 2015.

- 56 ALLMANN, S. et al. Cytosolic NADPH homeostasis in glucose-starved procyclic *Trypanosoma brucei* relies on malic enzyme and the pentose phosphate pathway fed by gluconeogenic flux. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 25, p. 18494-18505, 2013.
- 57 LEROUX, A. E. et al. Comparative studies on the biochemical properties of the malic enzymes from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, n. 1, p. 25–33, 2011.
- 58 RODRIGUEZ-CONTRERAS, D.; HAMILTON, N. Gluconeogenesis in *Leishmania mexicana*: Contribution of glycerol kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and pyruvate phosphate dikinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 47, p. 32989–33000, 2014.
- 59 KOVÁŘOVÁ, J.; BARRETT, M. P. The Pentose Phosphate Pathway in Parasitic Trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 8, p. 622-634, 2016.
- 60 DARDONVILLE, C. et al. Selective inhibition of *Trypanosoma brucei* 6-phosphogluconate dehydrogenase by high-energy intermediate and transition-state analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 13, p. 3427–3437, 2004.
- 61 GUPTA, S. et al. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase of Trypanosomatids: Characterization, Target Validation, and Drug Discovery. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–10, 2011.
- 62 PREUSS, J. et al. Discovery of a *Plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase inhibitor (R,Z)-N-((1-ethylpyrrolidin-2-yl)methyl)-2-(2-fluorobenzylidene)-3-oxo-3,4-dihydro-2H-benzo[b]-[1,4]thiazine-6-carboxamide (ML276) that reduces parasite growth in vitro. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 16, p. 7262–7272, 2013.
- 63 PREUSS, J. et al. High-throughput screening for small-molecule inhibitors of *plasmodium falciparum* glucose-6-phosphate dehydrogenase 6-phosphogluconolactonase. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 17, n. 6, p. 738–751, 2012.
- 64 PANDOLFI, P. P. et al. Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. **The EMBO Journal**, v. 14, n. 21, p. 5209–5215, 1995.

- 65 HO, H. YAO; CHENG, M. LING; CHIU, D. T. YEE. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. **Redox Report: Communications in Free Radical Research**, v. 12, n. 3, p. 109–118, 2007.
- 66 STANTON, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 362–369, 2012.
- 67 ZHANG, C. et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a biomarker and potential therapeutic target for cancer. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 2, p. 280–289, 2014.
- 68 PARK, J. et al. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase is associated with lipid dysregulation and insulin resistance in obesity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 12, p. 5146–5157, 2005.
- 69 PARK, J. et al. Increase in glucose-6-phosphate dehydrogenase in adipocytes stimulates oxidative stress and inflammatory signals. **Diabetes**, v. 55, n. 11, p. 2939–2949, 2006.
- 70 GUPTE, S. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 9, n. 9, p. 993–1000, 2008.
- 71 CAPPELLINI, M. D.; FIORELLI, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **Lancet**, v. 371, n. 9606, p. 64–74, 2008.
- 72 GUPTA, S.; CORDEIRO, A. T.; MICHELS, P. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is the target for the trypanocidal action of human steroids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 176, n. 2, p. 112–115, 2011.
- 73 CORDEIRO, A. T.; THIEMANN, O. H.; MICHELS, P. A. Inhibition of *Trypanosoma brucei* glucose-6-phosphate dehydrogenase by human steroids and their effects on the viability of cultured parasites. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2483–2489, 2009.
- 74 CORDEIRO, A. T.; THIEMANN, O. H. 16-bromoepiandrosterone, an activator of the mammalian immune system, inhibits glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* and is toxic to these parasites grown in culture. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 13, p. 4762–4768, 2010.
- 75 MARKS, P. A.; BANKS, J. Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 46, n. 4, p. 447–452, 1960.

- 76 GORDON, G.; MACKOW, M. C.; LEVY, H. R. On the mechanism of interaction of Steroids with Human Glucose 6-phosphate Dehydrogenase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n. 1, p. 25–29, 1995.
- 77 RAINERI, R.; LEVY, H. R. On the Specificity of Steroid Interaction with Mammary Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 9, n. 11, p. 2233–2243, 1970.
- 78 MCCORMICK, D. L. et al. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by dietary 16 $\alpha$ -fluoro-5-androsten-17-one (fluasterone), a minimally androgenic analog of dehydroepiandrosterone. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 2, p. 398–403, 2007.
- 79 HAMILTON, N. M. et al. Novel steroid inhibitors of glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 4431–4445, 2012.
- 80 BERMAN, H.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. **Nature Structural Biology**, v. 10, n. 12, p. 980, 2003.
- 81 ROWLAND, P. et al. The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. **Structure**, v. 2, n. 11, p. 1073–1087, 1994.
- 82 NAYLOR, C. E. et al. NADP<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup> binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. **Acta Crystallographica Section D**, v. 57, n. 5, p. 635–648, 2001.
- 83 COSGROVE, M. S. et al. An examination of the role of Asp-177 in the His-Asp catalytic dyad of *Leuconostoc mesenteroides* Glucose 6-phosphate Dehydrogenase: X-ray structure and pH dependence of kinetic parameters of D177N mutant enzyme. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15002–15011, 2000.
- 84 COSGROVE, M. S. et al. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 2759–2767, 1998.
- 85 AU, S. W. et al. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. **Structure**, v. 8, n. 3, p. 293–303, 2000.
- 86 KOTAKA, M. et al. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP<sup>+</sup> binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section D**, v. 61, n. 5, p. 495–504, 2005.

- 87 ORTÍZ, C. et al. Expression, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* in complex with substrate. **Acta Crystallographica Section F**, v. 67, n. Pt 11, p. 1457–1461, 2011.
- 88 BAUGH, L. et al. Increasing the structural coverage of tuberculosis drug targets. **Tuberculosis**, v. 95, n. 2, p. 142–148, 2015.
- 89 PREUSS, J. et al. Identification and characterization of novel human glucose-6-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 18, n. 3, p. 286–297, 2013.
- 90 IGOILLO-ESTEVE, M.; CAZZULO, J. J. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: Its role in the defense of the parasite against oxidative stress. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 170–181, 2006.
- 91 STUDIER, F. W. Protein Production by Auto-Induction in High-Density Shaking Cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 234, n. 1, p. 207–234, 2005.
- 92 RANZANI, A. T. **Estudos estruturais e funcionais da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase**. 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- 93 LOUNKINE, E.; WAWER, M.; WASSERMANN, A. M. SARANEA: A Freely Available Program To Mine Structure-Activity and Structure-Selectivity Relationship Information in Compound Data Sets. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 1, p. 68–78, 2010.
- 94 O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 33, p. 1-14, 2011.
- 95 KABSCH, W. XDS. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. 2, p. 125–132, 2010.
- 96 EVANS, P. R.; MURSHUDOV, G. N. How good are my data and what is the resolution? **Acta Crystallographica Section D**, v. 69, n. Pt 7, p. 1204–1214, 2013.
- 97 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v. 40, n. 4, p. 658–674, 2007.
- 98 EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. Pt 4, p. 486–501, 2010.
- 99 MURSHUDOV, G. N. et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. 4, p. 355–367, 2011.

- 100 CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D**, v. 66, n. Pt 1, p. 12–21, 2010.
- 101 DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 2, p. W665–W667, 2004.
- 102 BAKER, N. A. et al. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 18, p. 10037–10041, 2001.
- 103 SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.
- 104 OLIVEIRA, S. H. P. et al. KVFinder: steered identification of protein cavities as a PyMOL plugin. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 197, p. 1-8, 2014.
- 105 LEE, B.; RICHARDS, F. M. The interpretation of protein structures: Estimation of static accessibility. **Journal of Molecular Biology**, v. 55, n. 3, 379-400, 1971.
- 106 WINN, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. **Acta Crystallographica Section D**, v. 67, n. Pt 4, p. 235-242, 2011.
- 107 COHEN, P.; ROSEMEYER, M. A. Subunit Interactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase from Human Erythrocytes. **European Journal of Biochemistry/FEBS**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 1969.
- 108 COAN, K. E. D. et al. Promiscuous Aggregate-Based Inhibitors Promote Enzyme Unfolding. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 7, p. 2067–2075, 2009.
- 109 MCGOVERN, S. L. et al. A specific mechanism of nonspecific inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 20, p. 4265–4272, 2003.
- 110 ZHU, A.; ROMERO, R.; PETTY, H. R. An enzymatic fluorimetric assay for glucose-6-phosphate: application in an in vitro Warburg-like effect. **Analytical Biochemistry**, v. 388, n. 1, p. 97–101, 2009.
- 111 ZHANG, J.; CHUNG, T. D. Y.; OLDENBURG, K. R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 4, n. 2, p. 67–73, 1999.
- 112 KÜMMEL, A. et al. Integration of multiple readouts into the Z' factor for assay quality assessment. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 1, p. 95–101, 2010.
- 113 THORNE, N.; AULD, D. S.; INGLESE, J. Apparent Activity in HTS: Origins of Compound-Dependent Assay Interference. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 315–324, 2010.

- 114 ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.
- 115 FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.
- 116 LUNA, K. P. et al. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. **Biomedica: Revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 29, n. 3, p. 448–455, 2009.
- 117 MORENO, M. et al. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918–924, 2010.
- 118 AU, S. W. N. et al. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP<sup>+</sup> molecule and provides insights into enzyme deficiency. **Structure**, v. 8, n. 3, p. 293–303, 2000.
- 119 VIGUERA, A. R.; SERRANO, L. Side-chain interactions between sulfur-containing amino acids and phenylalanine in alpha-helices. **Biochemistry**, v. 34, n. 27, p. 8771–8779, 1995.
- 120 SILLITOE, I. et al. CATH: Comprehensive structural and functional annotations for genome sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D376–D381, 2015.
- 121 REID, K. S. C.; LINDLEY, P. F.; THORNTON, J. M. Sulphur-aromatic interactions in proteins. **FEBS Letters**, v. 190, n. 2, p. 209–213, 1985.

# **Anexos**



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



## DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "Glicose 6-fosfato desidrogenase como alvo molecular para desenvolvimento de fármacos: estudos estruturais e identificação de inibidores", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do(a) aluno(a): Gustavo Fernando Mercaldi

Assinatura: \_\_\_\_\_

Nome do orientador: Dr. Artur Torres Cordeiro

Data: 31 de maio de 2016.

**Profa. Dra. Rachel Meneguello**  
Presidente  
Comissão Central de Pós-Graduação  
**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada "Glicose 6-fosfato desidrogenase como alvo molecular para desenvolvimento de fármacos: estudos estruturais e identificação de inibidores", não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 31 de maio de 2016

Assinatura : 

Nome do autor: Gustavo Fernando Mercaldi

RG n.º 42432519-6

Assinatura : 

Nome do orientador: Dr. Artur Torres Cordeiro

RG n.º 152425-8