



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS



**Estudo da Constante de Afinidade de Inibidores da Principal Cisteína
Protease do *Trypanosoma cruzi***

Beatriz Siqueira Ho

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

SÃO CARLOS

2023

Beatriz Siqueira Ho

Estudo da Constante de Afinidade de Inibidores da Principal Cisteína Protease do
Trypanosoma cruzi

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como requisito final para a obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2023

AGRADECIMENTOS

Deus me mostrou que a perseverança recompensa, então, perseverarei nos meus objetivos, enfrentando com força e coragem todos os obstáculos que surgiram durante a minha caminhada. Meu Senhor reconheço a Tua graça em minha vida, e te agradeço por olhar por mim e me amar. Sem o Senhor nada disso seria possível.

Agradeço imensamente aos meus pais, Odila e Ronnie, por sempre estarem ao meu lado, por me ensinarem a viver a vida com alegria e otimismo, por me darem asas para voar alto e conselhos que levarei comigo para a vida toda, e por todo o amor e cuidado que dedicaram na minha criação e das minhas irmãs. Saibam que o mérito de todas as minhas conquistas te pertencem, tanto quanto a mim. Espero sempre deixá-los orgulhosos. E estendo o agradecimento a toda minha família que sempre esteve presente, torcendo por mim.

A minha melhor amiga e irmã, Gabriela, por acreditar no meu potencial e me incentivar a ser a minha melhor versão, por todas as risadas e “puxões de orelha”, pelo privilégio de partilhar a vida contigo.

Ao meu orientador, Carlos Alberto Montanari por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e produzir um trabalho significativo, onde desenvolvi competências e adquiri muito conhecimento.

A todos os membros do grupo NEQUIMED, por todo auxílio e conhecimento compartilhado nessa jornada. Agradeço especialmente a Dra. Fabiana Rosini e a Mestra Fernanda dos Reis Rocho, por me auxiliarem no laboratório, me ensinarem com tanta dedicação os métodos aplicados nesse trabalho, pela companhia e pela amizade; vocês foram essenciais na execução deste trabalho e tenho profunda admiração pelas profissionais que são.

Minha gratidão aos meus amigos, em especial as minhas queridas “Lindíssimas”, pela parceria e por todos os momentos de descontração que tornaram a minha vida acadêmica mais leve e divertida.

Por fim, gostaria de agradecer aos órgãos de fomento pelo financiamento dos projetos do grupo NEQUIMED, em especial ao CNPQ pelas bolsas concedidas a mim. Além disso, gostaria de agradecer ao Instituto de Química de São Carlos pela estrutura e suporte oferecidos durante os anos de graduação.

RESUMO

A enzima cruzaina é a principal cisteína protease presente no *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, e apresenta um papel biológico crucial no desenvolvimento e sobrevivência do parasito no interior das células hospedeiras, demonstrando-se um alvo muito promissor para o desenvolvimento de novos fármacos que atendam às necessidades do tratamento desta doença e apresentem uma melhor tolerância que o Nifurtimox e o Benzonidazol – únicos medicamentos disponíveis para o seu tratamento, que apesar da resolutividade, podem gerar graves efeitos colaterais. No presente trabalho foi estudada a afinidade entre a cruzaina e uma série de inibidores covalente reversíveis – sintetizados pelo grupo de Química Medicinal e Biológica (NEQUIMED) do IQSC – através da determinação das constantes de inibição destes inibidores. Dentre os inibidores estudados destacou-se o Neq1141, que apresentou alta potência contra a enzima alvo, tornando-se um possível candidato para futuros estudos mais específicos. Mediante o estudo da relação estrutura-atividade e da aplicação do método de análise de pares moleculares, demonstramos que a alteração de um grupo funcional em determinada posição do inibidor pode resultar em uma menor ou maior afinidade entre este e o sítio ativo da enzima. Além disso, foi realizado um estudo adicional que revelaram aspectos interessantes quanto a estabilidade da cruzaina expressa no laboratório e a importância do DTT (ditiotretol, agente redutor) na manutenção da atividade enzimática.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, cruzaina, cinética enzimática, inibidores covalentes reversíveis

ABSTRACT

The enzyme cruzain is the main cysteine protease present in *T. cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease, and plays a crucial biological role in the development and survival of the parasite inside host cells, proving to be a very promising target for the development of new drugs that meet the needs of the treatment of this disease and present a better tolerance than Nifurtimox and Benznidazole – the only drugs available for its treatment, which despite being resolvable, can generate serious side effects. In the present work, the affinity between cruzain and a series of reversible covalent inhibitors – synthesized by the Medicinal and Biological Chemistry Group (NEQUIMED) of the IQSC – was studied through the determination of the inhibition constants of these inhibitors. Among the inhibitors studied, Neq1141 stood out, which showed high potency against the target enzyme, making it a possible candidate for future more specific studies. Through the study of the structure-activity relationship and the application of the molecular pair analysis method, we demonstrated that the alteration of a functional group in a certain position of the inhibitor can result in a lower or higher affinity between it and the active site of the enzyme. Furthermore, an additional study was carried out that revealed interesting aspects regarding the stability of the cruzain expressed in the laboratory and the importance of DTT (dithiothreitol, reducing agent) in maintaining enzymatic activity.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, cruzain, enzymatic kinetics, reversible covalent inhibitors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Países afetados pela Doença de Chagas	10
Figura 2. Estrutura química dos compostos benzonidazol e nirfutimox	11
Figura 3. Representação da estrutura tridimensional da cruzaina, onde o domínio destacado em laranja é predominantemente formado por α -hélices e o destacado em verde por folhas- β antiparalelas. Evidenciado em preto, encontra-se o sítio catalítico da enzima ocupado pelo inibidor covalente N-(2-aminoetil)-n-alfa-benzoil-L-fenilalaninamida (33L)	12
Figura 4. Representação de superfície da cruzaina (em laranja) com destaque para os subsítios no seu sítio catalítico	13
Figura 5. Estrutura do composto K777	14
Figura 6. Estrutura molecular do substrato Z-FR-AMC	23
Figura 7. Velocidade em função da concentração de Z-FR-AMC para o ajuste não-linear da cruzaina na equação de Michaelis-Menten	24
Figura 8. Mecanismo de inibição competitiva	25
Figura 9. Curva de inibição obtida para o composto de controle Neq0570 contra a cruzaina, na presença do substrato Z-Phe-Arg-AMC (A) e sua estrutura molecular (B)	26
Figura 10. Estrutura molecular do DTT	29
Figura 11. Análise de MPPA do Neq1122 com dois compostos e seus respectivos valores de ΔpK_i , perante a cruzaina	30
Figura 12. Análise de MPPA do Neq1167 com o Neq1168 e o valor de ΔpK_i correspondente a modificação estrutural na posição P2, tendo como alvo a cruzaina	31
Figura 13. Análise de MPPA do Neq1183 com o Neq1184 e o valor de ΔpK_i correspondente a modificação estrutural na posição P3, tendo como alvo a cruzaina	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da cruzaína variando-se a temperatura de ativação	22
Tabela 2. Resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da cruzaína variando-se o pH do tampão de ativação	23
Tabela 3. Resultados obtidos de K_M e V_{max} para a cruzaína através da equação de Michaelis-Menten	24
Tabela 4. Inibidores testados e seus respectivos valores de pK_i e % inibição	26
Tabela 5. Resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da cruzaína variando-se a concentração de DTT	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

K_i – Constante de Inibição

K_M – Constante de Michaelis-Menten

V_{max} – Velocidade máxima

k_{cat} – Constante de Velocidade de Primeira Ordem, “*turnover*”

MMPA – Análise de Pares Moleculares Combinados (do inglês, *Matched Molecular Pair Analysis*)

SAR – Relação Estrutura-Atividade (do inglês, *Structure-Activity Relationship*)

Z-FR-AMC – Z-fenilalanina-arginina-7-amido-4-metilcumarina

DTT – Ditioneitol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Doença de Chagas	9
1.2	Cruzaína	11
1.3	Inibidores seletivos de cruzaína e a busca por novos fármacos antichagásicos	13
1.4	Relação Estrutura-Atividade e Análise de Pares Moleculares Combinados (MMPA) na descoberta de novos fármacos	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	Expressão e Purificação da Cruzaína	17
3.1.1	Transformação das células	17
3.1.2	Expressão da Cruzaína	17
3.1.3	Purificação	18
3.1.4	Etapa de Ativação	19
3.2	Ensaio de Cinética Enzimática	19
3.2.1	Determinação da Constante de Michaelis (K_M)	20
3.2.2	Determinação da Constante de Inibição (K_i)	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Estudo de Estabilidade da Cruzaína	22
4.2	Caracterização Cinética dos Inibidores Covalentes Reversíveis Estudados	23
4.3	Estudo da Importância do DTT em Reações Enzimáticas	28
4.4	Estudo da Relação Estrutura-Atividade	30
5	CONCLUSÃO	33
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
7	APÊNDICE	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

As Doenças Tropicais Negligenciadas são causadas por parasitos que invadem as células do hospedeiro para a sua reprodução, dentre estas destacam-se doenças como a malária, a doença de Chagas, a leishmaniose visceral, a dengue e a esquistossomose. Tais doenças representam sérios problemas de saúde pública, consistindo em algumas das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o planeta. As doenças negligenciadas são endêmicas, acometendo, particularmente, a população mais pobre e vulnerabilizada; e dispõem de escasso investimento em pesquisa e medidas públicas de controle.¹

Os avanços alcançados nas áreas Química e Biológica, ao longo dos anos, possibilitaram a descrição de mecanismos fisiopatológicos e farmacológicos que, por sua vez, contribuíram para a construção de conhecimento significativo sobre as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas de possíveis fármacos e o processo de reconhecimento molecular. A combinação de diversas áreas da ciência e tecnologia culminou no planejamento e descoberta de novos fármacos, que inovaram no tratamento terapêutico de inúmeras doenças.²

A tripanossomíase americana, atualmente conhecida como doença de Chagas, foi descrita em 1909 pelo médico sanitarista Carlos Chagas e pode ser considerada uma antroponose derivada das alterações produzidas pelo ser humano no meio ambiente e das desigualdades econômicas. Está presente na Europa, Japão, Austrália e em todas as Américas, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Chile – sendo endêmica em 21 países da América Latina. Estima-se que, aproximadamente, 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas, e 70 milhões de pessoas em risco de contrair a doença. A doença de Chagas é uma das patologias com maior distribuição no continente americano e apresenta uma taxa de 7.000 mortes por ano na América Latina.³

A Figura 1 representa as áreas de distribuição da doença de acordo com dados coletados em 2019, as áreas destacadas em laranja escuro são países em que a ocorrência da doença é endêmica.

Figura 1. Países afetados pela Doença de Chagas



Fonte: Adaptada de dndi.org

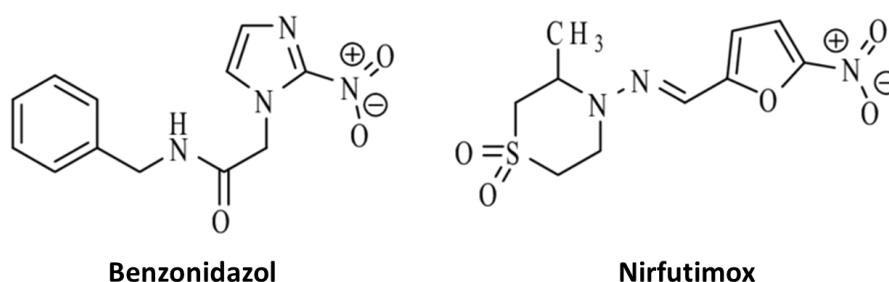
A doença de Chagas se manifesta clinicamente em duas fases distintas, a aguda (sintomática ou não) e a crônica, cuja forma cardíaca é a responsável pela expressiva morbimortalidade desta doença. Apesar de uma redução significativa na taxa de casos de doença de Chagas aguda (DCA), nos últimos 15 anos foram registrados casos sistemáticos relacionados à transmissão oral (pela ingestão de alimentos contaminados) e vetorial extradomiciliar (pela ocupação dos ecótipos deste agente, e conseguinte inclusão no ciclo epidemiológico da doença), sobretudo na região amazônica. Devido à alta incidência durante o século XX, estima-se que, atualmente, pelo menos 1 milhão de brasileiros estejam infectados por *Trypanosoma cruzi* (protozoário flagelado causador da doença de Chagas).⁴

Embora conhecida a mais de 200 anos, a Doença de Chagas apresenta apenas dois medicamentos para o seu tratamento, o Nifurtimox e o Benzonidazol (Figura 2), sendo que estes provieram de diferentes terapias. À vista disto, pode-se considerar a Doença de Chagas como a “negligenciada” entre as doenças tropicais negligenciadas, sendo isto consequência de um cenário socioeconômico onde grande parcela da população infectada é de baixa renda, não representando, então, um forte mercado consumidor. Desse modo, há um diminuto investimento em pesquisa, gerando um desestímulo na produção e busca de novos fármacos.^{5,6}

No Brasil, o único fármaco disponível para o tratamento específico da doença de Chagas é o Benzonidazol, que é distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Apesar deste medicamento apresentar resolutividade e ser consideravelmente seguro, o seu uso pode

gerar efeitos adversos que têm sido frequentemente relatados na literatura.^{7,8} Dentre os mais graves efeitos adversos destacam-se a dermatopatia alérgica, depressão da medula óssea e a polineuropatia periférica.⁶ Desse modo, pode-se afirmar que é de extrema relevância a busca e o desenvolvimento de novos fármacos que atendam as necessidades do tratamento e apresentem melhor tolerância.

Figura 2. Estrutura química dos compostos benzonidazol e nirfutimox



Fonte: Adaptada de MENEZES, J.C.L., *et al.*⁹

1.2 Cruzaína

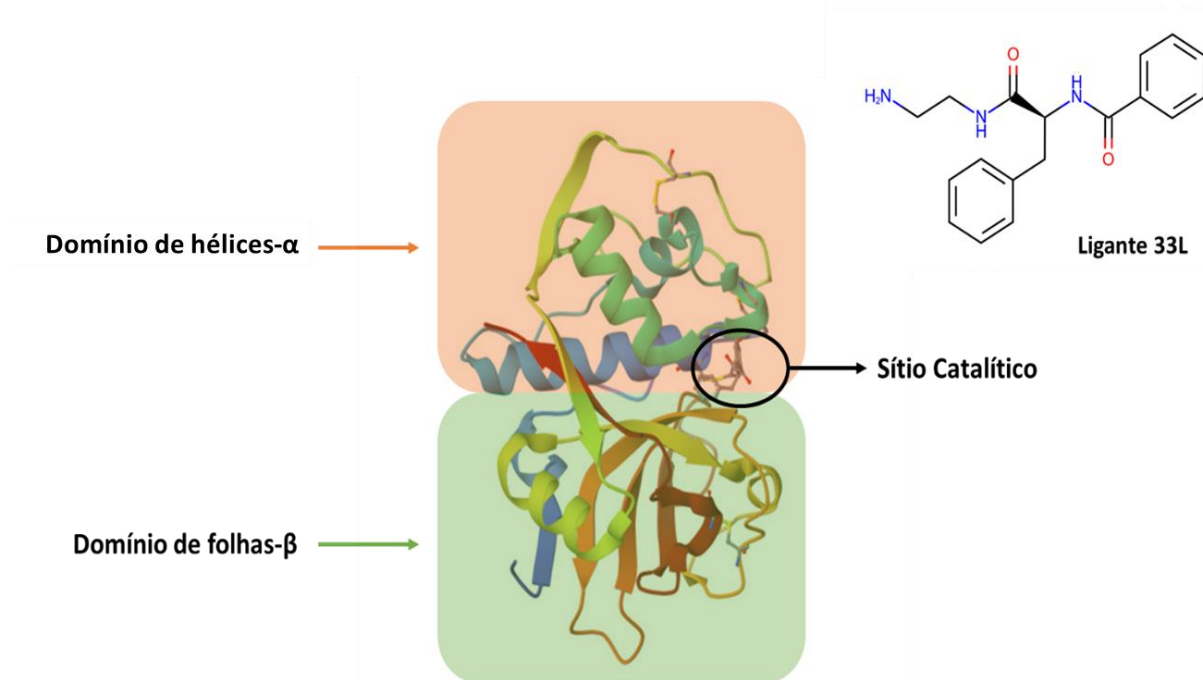
Atualmente, as enzimas têm sido consideradas alvos extremamente atraentes para a intervenção farmacológica, devido aos seus papéis essenciais em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos. Moléculas *drug-like* de baixo peso molecular apresentam atividade inibitória em determinantes estruturais do processo de catálise enzimática, desse modo, há um vasto interesse no estudo de enzimas com a finalidade de identificar moléculas inibidoras que possibilitem a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos.¹⁰

A enzima cruzaína (também denominada cruzipaína, se isolada na forma nativa completa), principal cisteíno protease presente no *T. cruzi*, possui um papel essencial no desenvolvimento e sobrevivência do parasito, atuando na invasão de macrófagos por tripomastigotas, na multiplicação intracelular e na alteração da resposta imune do hospedeiro.^{11,12} Por apresentar uma das melhores caracterizações dentre as cisteíno proteases parasitárias, notável evidência de validação pré-clínica e ser o principal fator de virulência do *T. cruzi*, a cruzaína é considerada um potencial alvo para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas.¹³

A cruzaína é uma cisteíno protease similar a papaína e pertence à família C1, que catalisa reações de hidrólise em ligações peptídicas internas da cadeia polipeptídica. Especificamente, essa enzima é responsável pela degradação de proteínas das células hospedeiras corroborando para o resultado da infecção. De acordo com as informações disponíveis no *Protein Data Bank*

(PDB), a estrutura tridimensional do domínio catalítico da cruzaína – representada na Figura 3 – é muito semelhante à da papaína e da catepsina L, sendo composto por uma cadeia polipeptídica de 215 resíduos dobrados em dois domínios: um predominantemente composto por hélices- α (C-terminal) e outro de folhas- β antiparalelas (N-terminal). Na interface entre estes domínios localiza-se o sítio ativo da enzima que engloba a tríade catalítica, formada pelos aminoácidos: Cys25, His159 e Asn175.¹³

Figura 3. Representação da estrutura tridimensional da cruzaína, onde o domínio destacado em laranja é predominantemente formado por hélices- α e o destacado em verde por folhas- β antiparalelas. Evidenciado em preto, encontra-se o sítio catalítico da enzima ocupado pelo inibidor covalente N-(2-aminoetil)-nalfa-benzoil-L-fenilalaninamida (33L)

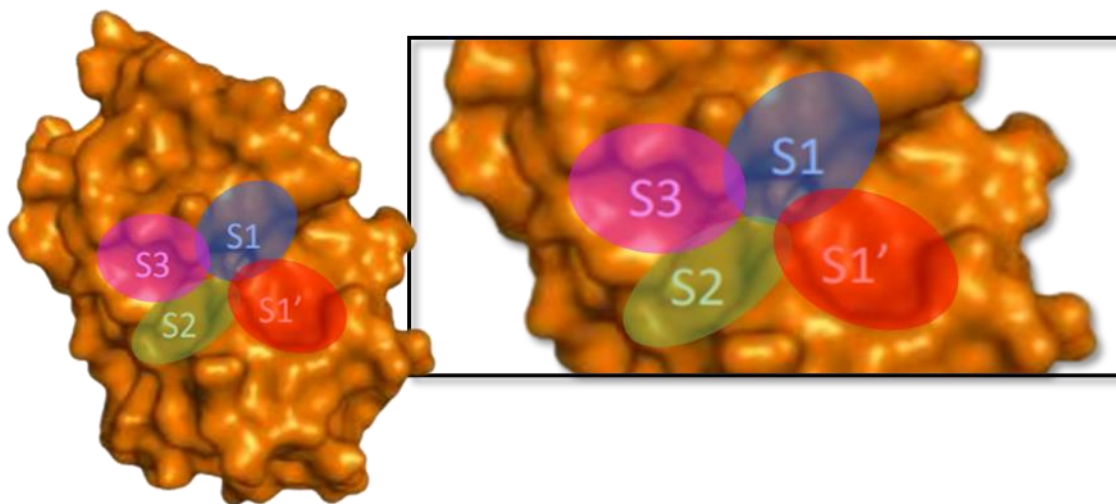


Fonte: Adaptado de RSCB Protein Data Base.¹⁴

O sítio catalítico é subdividido em quatro subsítios de ligação, denominados S1, S2, S3 e S1', como representado na Figura 4. Cada subsítio apresenta características moleculares particulares, sendo que o subsítio S2 é o principal responsável pela especificidade da enzima. Dentre os subsítios, o S2 (verde) é o estruturalmente menos exposto ao solvente, sendo delimitado por cadeias laterais de resíduos hidrofóbicos, este subsítio se apresenta por grupamentos apolares. Enquanto os subsítios S1 (azul), S3 (rosa) e S1' (vermelho) apresentam menor definição e maior exposição ao solvente, contudo são formados por resíduos de

aminoácidos relevantes para o reconhecimento e posicionamento de ligantes – por exemplo, o subsítio S1 abriga o resíduo Cys25, enquanto no subsítio S1' estão presentes os outros dois resíduos da tríade catalítica, Hys159 e Asn175.^{15,16}

Figura 4. Representação de superfície da cruzaina (em laranja) com destaque para os subsítios no seu sítio catalítico.



Fonte: Adaptado de SOUZA, M. L.; *et al.*¹⁷

1.3 Inibidores seletivos de cruzaina e a busca por novos fármacos antichagásicos

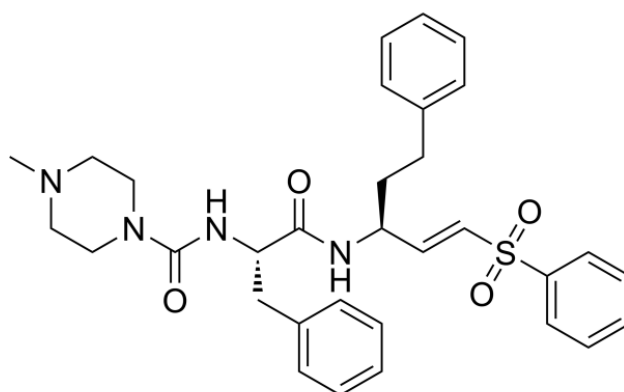
O estudo de inibidores seletivos da cruzaina representa um caminho com grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antichagásicos, pois, como têm sido demonstrado em diversas pesquisas, o uso de tais inibidores sobre o sítio ativo da enzima bloqueia a proliferação do parasito epimastigota extracelular e amastigota intracelular, além de suspender a metaciclogênese – isto é, impedem a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (forma infectante do parasito) – levando a morte do agente do parasito do *T. cruzi*.^{18,19}

A atividade da cruzaina pode ser modulada por diversas classes de inibidores covalentes. Visto que, os mecanismos de inibição se baseiam em mimetizar ou participar em uma das etapas da reação catalítica, os inibidores covalentes se baseiam no estado de transição da reação catalisada pela enzima.²⁰ Nestes compostos estão presentes grupos funcionais contendo um átomo de carbono propenso ao ataque nucleofílico realizado pelo resíduo de cisteína ativado presente no sítio catalítico da enzima. O ataque nucleofílico dependerá de sua natureza,

podendo promover a reação reversível ou irreversível do inibidor com os grupos funcionais do sítio ativo, promovendo a alteração global da estrutura da enzima.¹⁹

Além disso, estudos constataram que determinados inibidores de cruzaina possuem atividade tripanocida com diminuta toxicidade em mamíferos.²¹ Esforços anteriores identificaram diferentes classes de compostos como inibidores com alta afinidade para esta enzima, como as fluorometilcetonas, as α -cetoamidas, os α -cetoésteres, os sulfonatos, as sulfonamidas e as vinilsulfonas. Dentre essas, destaca-se o inibidor irreversível da classe das vinilsulfonas, o composto K777, ilustrado na Figura 5. Este inibidor demonstrou grande eficácia nos ensaios pré-clínicos e *in vivo*, incluindo atividade tripanocida contra tripomastigotas em um ensaio de cultura celular e perfis farmacocinéticos em animais.²²

Figura 5. Estrutura do composto K777



Fonte: Domínio público, site MedChemExpress²³

Entretanto, o K777 apresentou graves problemas relacionados à sua elevada hepatotoxicidade, tendo em vista que se trata de um inibidor irreversível devem ser consideradas as particularidades da sua eficácia, devido aos seus complexos e inesperados mecanismos de ação, sendo necessárias avaliações pré-clínicas mais rigorosas.¹³ Desse modo, muitos desses possíveis fármacos, não são aprovados para uso clínico e aqueles que são aprovados estão passíveis à uma crescente resistência parasitária. Portanto, é necessário o desenvolvimento de novos candidatos terapêuticos.²¹

Uma forma de investigar o potencial inibitório de possíveis candidatos a fármacos consiste no estudo de sua afinidade com sua enzima alvo, que pode ser realizado através de um método fluorimétrico (que foi aplicado nesse trabalho) e avaliado mediante o estudo da relação estrutura-atividade, abordado a seguir.

1.4 Relação Estrutura-Atividade e Análise de Pares Moleculares Combinados (MMPA) na descoberta de novos fármacos

O estudo da “relação estrutura-atividade” (do inglês, *structure activity relationship*, SAR) em Química Medicinal, corresponde à análise dos efeitos causados pela estrutura química de um composto durante a sua interação com o receptor biológico e a consequente racionalização dos principais fatores que governam esta interação.²⁴

As interações entre um ligante e seu receptor biológico são definidas por forças intermoleculares, isto é, interações polares, lipofílicas, estéreas e eletrostáticas. Desse modo, um fármaco deve conter em sua estrutura tridimensional grupos funcionais dispostos de maneira que proporcionem uma maior complementaridade ao subsítio de ligação do alvo específico (uma enzima ou qualquer outra macromolécula biológica). Resumidamente, quanto melhor o “encaixe” de um composto terapêutico, maior será sua afinidade com o subsítio de ligação, gerando uma atividade biológica superior.²⁴

Geralmente, moléculas semelhantes apresentam propriedades semelhantes, no entanto, isso não se aplica a todos os casos. A similaridade química é relevante no estabelecimento de relações entre estrutura e atividade e na compreensão do comportamento de determinado grupo de compostos. Essa pode ser utilizada na identificação de um núcleo em comum em um determinado número de estruturas para executar uma análise de pares moleculares combinados (MMPA). A MMPA é um método que busca a identificação e a comparação de pares de moléculas semelhantes de um conjunto de compostos, bem como, a avaliação da mudança de propriedade associada.²⁵

Os pares combinados são compostos que possuem apenas um grupamento químico diferente em sua composição. Assim, a MMPA pode demonstrar mudanças nas propriedades biológicas ou potências inibitórias entre compostos terapêuticos com alta similaridade estrutural. Sendo assim, a combinação de SAR e MMPA pode ser considerada como uma importante ferramenta no desenvolvimento e otimização de fármacos.²⁵

No presente trabalho, a análise de MMPA/SAR levou em consideração a diferença de afinidade relacionada à uma alteração estrutural, tal diferença é dada por ΔpK_i (calculado pela diferença de afinidade entre duas moléculas). Sendo que valores superiores a 1 unidade logarítmica ($\Delta pK_i > 1$) foram considerados significativos para a afinidade.^{25,26}

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade inibitória de 36 inibidores covalentes reversíveis, sintetizados pelo grupo NEQUIMED/IQSC/USP, frente a enzima cruzaína.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Analisar os parâmetros cinéticos do substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC;
- II. Determinar a constante de inibição (K_i) para uma série de inibidores frente a cruzaína, utilizando um método fluorimétrico;
- III. Selecionar pares de compostos para analisá-los quanto às suas estruturas e atividades com a enzima alvo;
- IV. Avaliar a estabilidade da cruzaína expressa, mediante o estudo de parâmetros moduladores de sua atividade específica;
- V. Estudar a importância do DTT na manutenção da atividade enzimática.

3 MATERIAIS E METÓDOS

3.1 Expressão e Purificação da Cruzaína

3.1.1.1 Transformação das células

Em uma solução de 100 μL de células de *E. coli* Artic Express DE3-RIL (Agilent), previamente descongelada, foram adicionados 3 μL do plasmídeo (80 ng/ μL – Epoch Life Science). A solução foi colocada em um banho de gelo durante 30 minutos. Em seguida, foi realizado o choque térmico a 42°C em banho-maria por 30 segundos e, então, a solução retornou para o banho de gelo por mais 3 minutos. Logo após, foram adicionados 250 μL de meio SOC (Sigma-Aldrich) e a solução foi colocada em uma incubadora shaker a 37°C e 250 rpm durante 1 hora.

Neste intervalo, foi preparada uma placa de petri com meio LB-Ágar contendo 20 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Então, a solução contendo a bactéria e plasmídeo foi espalhada no meio LB-Ágar, e a placa foi colocada em uma estufa a 37°C *overnight*. No dia seguinte, notou-se o crescimento das colônias e a placa foi retirada da estufa e armazenada.

3.1.1.2 Expressão da Cruzaína

A. Meio de cultura para a etapa de indução

Foi preparado e autoclavado 1 L de meio de cultura, dissolvendo-se em 900 mL de água milli-Q: 10 g de N,Z-amina (Sigma-Aldrich), 5 g de extrato de levedura (Sigma-Aldrich) e 5 mL de glicerol (Vetec).

B. Sais

Foram preparadas e autoclavadas soluções de:

- 23 mM de fosfato de sódio dibásico (Sigma-Aldrich);
- 23 mM de fosfato de potássio monobásico (Sigma-Aldrich);
- 45 mM de cloreto de amônio (Vetec);
- 4,5 mM de sulfato de sódio (Sigma-Aldrich);
- 1,8 mM de sulfato de magnésio (Sigma-Aldrich).

C. Antibióticos

Foram preparadas as soluções dos antibióticos ampicilina e gentamicina em concentrações de, respectivamente, 100 µg/mL e 20 µg/mL.

D. Açúcares

Foram preparadas soluções de 0,045% w/v de D-glicose (Vetec) e 0,18% w/v de α -Lactose monoidratada (Sigma-Aldrich).

E. Pré-inóculo

Foram autoclavados três erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de meio LB (Sigma-Aldrich). Na capela de fluxo laminar, foram adicionados em cada frasco: os antibióticos (gentamicina e ampicilina) e uma colônia (a mais isolada). Em seguida, os erlenmeyers foram colocados na incubadora shaker (Marconi) a 37°C e 250 rpm, *overnight*. Após este período, foi medida a D.O. em 600 nm (Densidade Óptica) da solução.

F. Meio de alta indução

Ao meio preparado no item A foram adicionados os sais, os açúcares, os antibióticos e o volume suficiente de solução contendo a bactéria para iniciar a D.O._{600 nm} em 0,16. Então, a mistura foi colocada em uma incubadora shaker a 18°C e 200 rpm por 72 horas. Após esse período, a solução foi centrifugada a 9000 rpm (Hitachi, modelo CR21GIII) a 4°C e o pellet foi congelado e armazenado a -80°C.

3.1.1.3 Purificação

Para a etapa de purificação, foram preparadas as seguintes soluções:

- **Tampão A:** 50 mM de Tris, 300 mM de NaCl e 10 mM de imidazol (pH=10);
- **Tampão B:** 50 mM de Tris, 300 mM de NaCl e 500 mM de imidazol (pH=10);
- **Solução de lise:** a solução preparada para um pellet de 500 mL do meio de cultura continha 60 mL de tampão A, 0,5 mM de cloreto de cálcio, 0,5 mM de sulfato de magnésio, 20 µL de DNase, alguns miligramas de lisozima e 100 µM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil).

Inicialmente, o pellet foi ressuspenso na solução de lise, que em seguida foi deixada em repouso no gelo por 1 hora. Após o repouso, a solução foi sonicada com o auxílio de um desmembrador sônico (*Fisher Scientific Sonic Dismembrator*, modelo 500) configurado para 30 segundos de pulso *on* e 30 segundos de pulso *off*.

Em seguida, a solução foi centrifugada a 19000 rpm durante 30 minutos. A solução sobrenadante foi misturada a 5 mL de resina de níquel (Ni, *Sepharose 6 fast flow*, GE Healthcare) e permaneceu sob agitação, em um agitador magnético, por cerca de 3 horas a 4°C (sendo utilizada a câmara fria do laboratório para garantir a temperatura ideal nesta etapa). Então, a solução foi inserida em uma coluna de bancada e a resina foi lavada com 50 mL de tampão A e, em seguida, a proteína foi eluída com 60 mL do tampão B.

A solução contendo a proteína passou por uma etapa de diálise, utilizando-se uma membrana de diálise de 10 kDa e tampão de ativação (100 mM de acetato de sódio, 5 mM de EDTA e 300 mM de cloreto de sódio; pH=5,5), onde permaneceu sob agitação frequente a 4°C *overnight*. No dia seguinte, a solução do meio foi substituída por mais 1 L do mesmo tampão e permaneceu sob agitação por 6 horas a 4°C. Por fim, o pH foi medido e ajustado para 5,2 (pH de atividade ótima da cruzaína); e a solução de proteína foi diluída para uma concentração menor ou igual a 0,5 mg/mL a fim de evitar a precipitação durante a etapa de ativação – para a medição da concentração foi utilizado o Denovix DS-11 + Spectrophotometer.

3.1.1.4 Etapa de ativação

Foi adicionado 1 mM de β -mercaptoetanol à solução de proteína e esta foi colocada no shaker (Marconi) por cerca de 1 hora, a 37°C sob agitação lenta. Por fim, a solução de proteína foi centrifugada a 4500 RCF durante 30 minutos, utilizando amicon Ultra, Merck-Millipore (10 kDa) – a fim de concentrá-la. Após esta etapa, a solução foi alíquotada, congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C.

3.2 Ensaios de Cinética Enzimática

Os ensaios foram realizados no equipamento leitor de microplacas fluorimétrico – modelo Synergy™ HT Multi-detection microplate reader, Biotek®.

3.2.1.1 Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_M)

Os ensaios cinéticos enzimáticos para a cruzaína foram realizados a 25°C em 200 µL de uma solução composta por tampão (pH=5,5) de acetato de sódio 100 mM, NaCl 300 mM e EDTA 1 mM; ditioneitol 5 mM (DTT); 5% v/v/ dimetilsulfóxido (DMSO); 0,01% v/v Triton X-100; sendo que, a concentração utilizada para a enzima foi de 0,28 nM. Foram utilizadas microplacas pretas com 96 poços de fundo plano, e a taxa de velocidade da reação foi monitorada no leitor de placas Biotek Synergy HT por 15 minutos, em um comprimento de onda de emissão de 460 nm (excitação a 360 nm), em função da hidrólise do substrato Z-Phe-Arg-7-amido-4-metilcumarina (Z-FR-AMC).

A ativação da enzima foi realizada em banho de gelo em uma solução – contendo tampão de ensaio (pH=5,5), 5 mM de DTT e 0,014% de Triton X-100 – por 15 minutos.

Foram preparadas 8 soluções de substrato com um fator de diluição de 0,5, partindo de uma concentração inicial de substrato de 30 µM. Em cada poço foram adicionadas alíquotas de 8 µL de dimetilsulfóxido (DMSO), 142 µL da solução contendo a enzima e 50 µL da solução de substrato; sendo que os ensaios foram realizados em triplicatas com a finalidade de avaliar possíveis erros experimentais.

As velocidades iniciais de hidrólise do substrato, sob reação de primeira ordem, foram calculadas pelo software Gen5 Biotek com base no coeficiente de regressão linear com fundamento no ajuste dos dados da Unidade de Fluorescência Relativa (RFU) em função do tempo (segundos). E o SigmaPlot 10 foi aplicado para o tratamento dos dados e determinação dos parâmetros cinéticos.

3.2.1.2 Determinação da constante de inibição (K_i)

Os ensaios de inibição enzimática foram realizados de forma semelhante aos ensaios para a determinação da constante de Michaelis-Menten (item 3.2.1.1). Entretanto, nos ensaios de inibição enzimática a concentração de substrato é fixada, sendo considerado o valor obtido no ensaio de cinética, onde $[S] = K_M$.

Desse modo, foram preparadas a solução de substrato, a solução contendo a enzima e 7 soluções do composto inibidor com um fator de diluição de 0,5 (onde as concentrações iniciais variaram de 50 a 0,1 µM). As alíquotas de 8 µL das soluções dos inibidores foram adicionadas

sequencialmente nos poços, sendo que no último poço foram adicionados 8 µL de DMSO (para fins de controle).

Em seguida, no leitor de microplacas fluorimétricos foram injetados, em cada poço, 142 µL da solução contendo a enzima e – após um período de incubação de cerca de 2 minutos – 50 µL de substrato; sendo que os ensaios foram feitos em triplicatas.

A constante de inibição foi determinada no OriginPro 8.5, aplicando a correção do valor obtido para a constante de inibição aparente (K_i^{ap}) pela equação de Cheng-Prusoff, descrita abaixo.

$$K_i = \frac{K_i^{ap}}{1 + \frac{[S]}{[K_M]}} \quad (1)$$

Como a concentração do substrato é igual ao valor de K_M , temos:

$$K_i = \frac{K_i^{ap}}{2} \quad (2)$$

E o valor de pK_i foi calculado da seguinte forma:

$$pK_i = -K_i \quad (3)$$

Tais cálculos foram aplicados para todos os inibidores testados, e os resultados obtidos serão apresentados no tópico a seguir.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo de Estabilidade

A estabilidade da cruzaína expressa foi estudada a partir da análise de dois parâmetros importantes na ativação da proteína: a temperatura e o pH. Para isto foram realizados quatro ensaios de inibição enzimática com o composto de controle (Neq0570), como descrito no tópico 3.2.1.1., variando-se a temperatura de ativação e o pH do tampão de ativação – sendo que tais parâmetros foram avaliados isoladamente, ou seja, em cada ensaio foi alterado apenas um deles, como descrito a seguir:

- I. Banho de gelo (como descrito no protocolo);
- II. Temperatura ambiente (25°C);
- III. Tampão Acetato (pH = 5,5);
- IV. Tampão Tris (pH = 7,5).

Sabe-se que a cruzaína apresenta estabilidade sob baixa temperatura, devido à possibilidade de auto degradação, e ótima atividade em meio levemente ácido. Como apresentado nas Tabelas 1 e 2, os resultados obtidos neste estudo estão em conformidade com o descrito na literatura, uma vez que os valores de pK_i obtidos para o composto padrão nos ensaios em que a ativação da proteína foi feita em banho de gelo e no tampão acetato (pH = 5,5) estavam dentro da faixa de 6,5 – 6,7; enquanto, os valores de pK_i obtidos para o composto padrão nos ensaios em que a ativação da proteína foi feita sob 25°C e pH = 7,5 desviaram do ideal.

Tabela 1. Resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da cruzaína variando-se a temperatura de ativação

Temperatura	pK_i
Banho de gelo ($\cong 0^\circ\text{C}$)	$6,6 \pm 0,01$
25°C	$6,4 \pm 0,01$

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2. Resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da cruzaína variando-se o pH do tampão de ativação

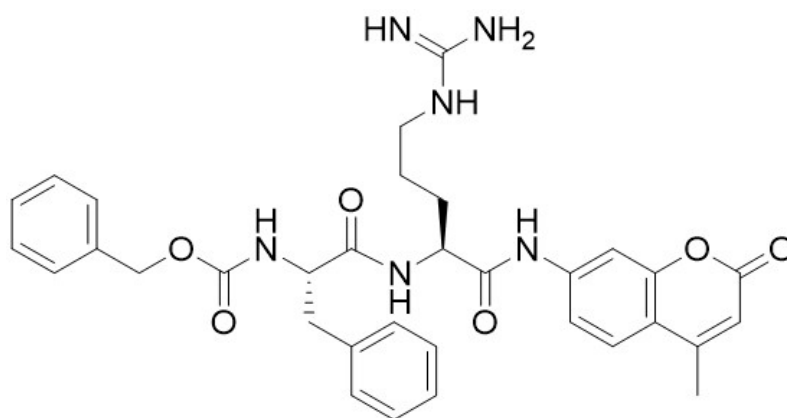
pH	p <i>K</i> _i
5,5	6,6 ± 0,01
7,5	5,3 ± 0,19

Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Caracterização Cinética dos Inibidores Covalentes Reversíveis Estudados

Com a finalidade de avaliar a atividade da enzima cruzaína expressa, os valores de K_M e V_{max} foram determinados mediante a equação de Michaelis-Menten. Nos ensaios, o substrato Z-FR-AMC – representado na Figura 6 – foi utilizado, sendo que este foi clivado pela enzima através de uma reação de hidrólise liberando 7-amino-4-metilcumarina, grupo responsável pela geração de fluorescência.

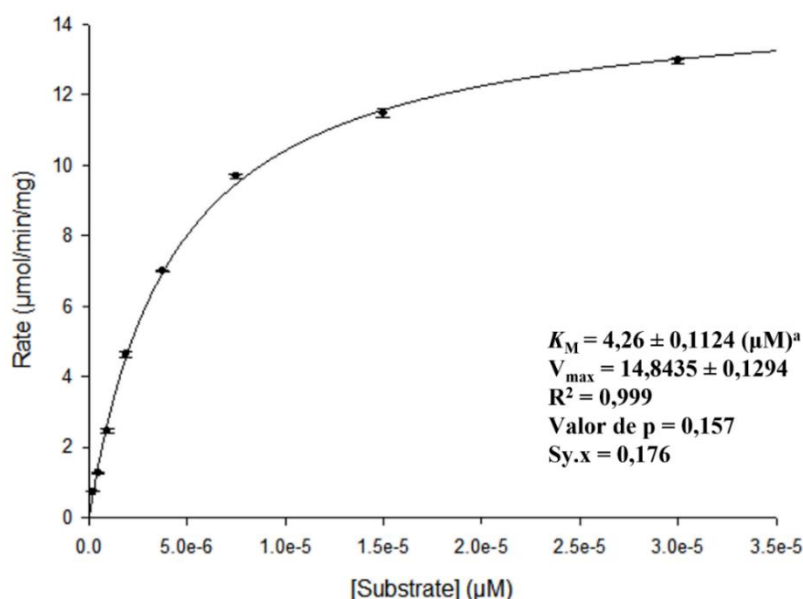
Figura 6. Estrutura molecular do substrato Z-FR-AMC



Fonte: Domínio público, site Echelon Biosciences.³⁵

O gráfico de velocidade da reação ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) em função da concentração (μM) do substrato Z-FR-AMC para o ajuste não-linear da cruzaína na equação de Michaelis-Menten, está apresentado na Figura 7.

Figura 7. Velocidade em função da concentração de Z-FR-AMC para o ajuste não-linear da cruzaina na equação de Michaelis-Menten



^a Obtido mediante a aplicação de $v = \frac{V_{\max}[S]}{K_M + [S]}$

O resultado obtido para a constante de Michaelis-Menten foi satisfatório e condizente com o descrito em literatura, ou seja, um valor experimental de K_M dentro da faixa de 1 a 5,2 μM de acordo com o website *BRENDA Enzyme Database*. No ponto de vista prático, a constante de Michaelis-Menten é um indicativo da afinidade entre uma enzima e determinado substrato. Assim, o baixo valor obtido para o K_M da cruzaina indica uma alta afinidade pelo substrato.²⁷

Tabela 3. Resultados obtidos de K_M e $V_{\max}$ para a cruzaina através da equação de Michaelis-Menten

$K_M (\mu\text{M})$	$V_{\max} (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1})$	$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_M (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$
$2,9 \pm 0,1$	$14,4 \pm 0,1$	5,44	$2,58 \times 10^6$

*Resultados obtidos através da média de duas medidas

Conforme apresentado na Tabela 3, a partir dos valores de K_M e $V_{\max}$ obtidos nos ensaios ilustrativamente representados na Figura 7 e na Figura 16 (no item 7), foram calculados o número de renovação (k_{cat} ; através da equação (4)) e a eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) da enzima. A cruzaina apresentou resultados satisfatórios em relação à sua atividade, possuindo altos

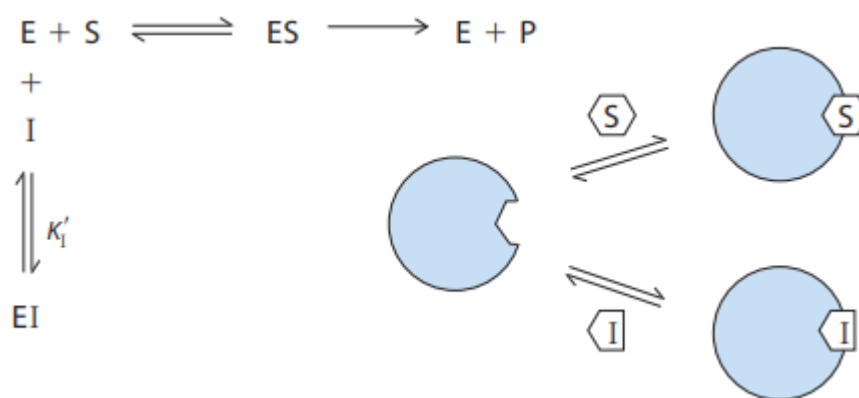
valores de k_{cat} e k_{cat}/K_M , demonstrando uma elevada taxa de conversão do substrato em produto. Além disso, tais parâmetros cinéticos são condizentes com os descritos na base de dados BRENDA.²⁸

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_t]} \quad (4)$$

Onde, V_{max} é a velocidade máxima da reação e $[E_t]$ é a concentração total da enzima no experimento. Após avaliada a atividade da enzima e obtido o valor de K_M , foram realizados os ensaios de inibição enzimática com uma série de inibidores covalentes reversíveis.

No caso dos ensaios de inibição enzimática realizados no presente trabalho, os inibidores foram incubados com a cruzaina e, posteriormente, a solução de substrato foi adicionada aos poços. Nesse momento, o equilíbrio da reação será deslocado, favorecendo a formação do complexo enzima-substrato (ES) (mecanismo de inibição competitiva, ilustrado na Figura 8). Na medida em que o substrato se liga ao sítio ativo da enzima, ocorrerá a sua hidrólise e um sinal de fluorescência será observado.

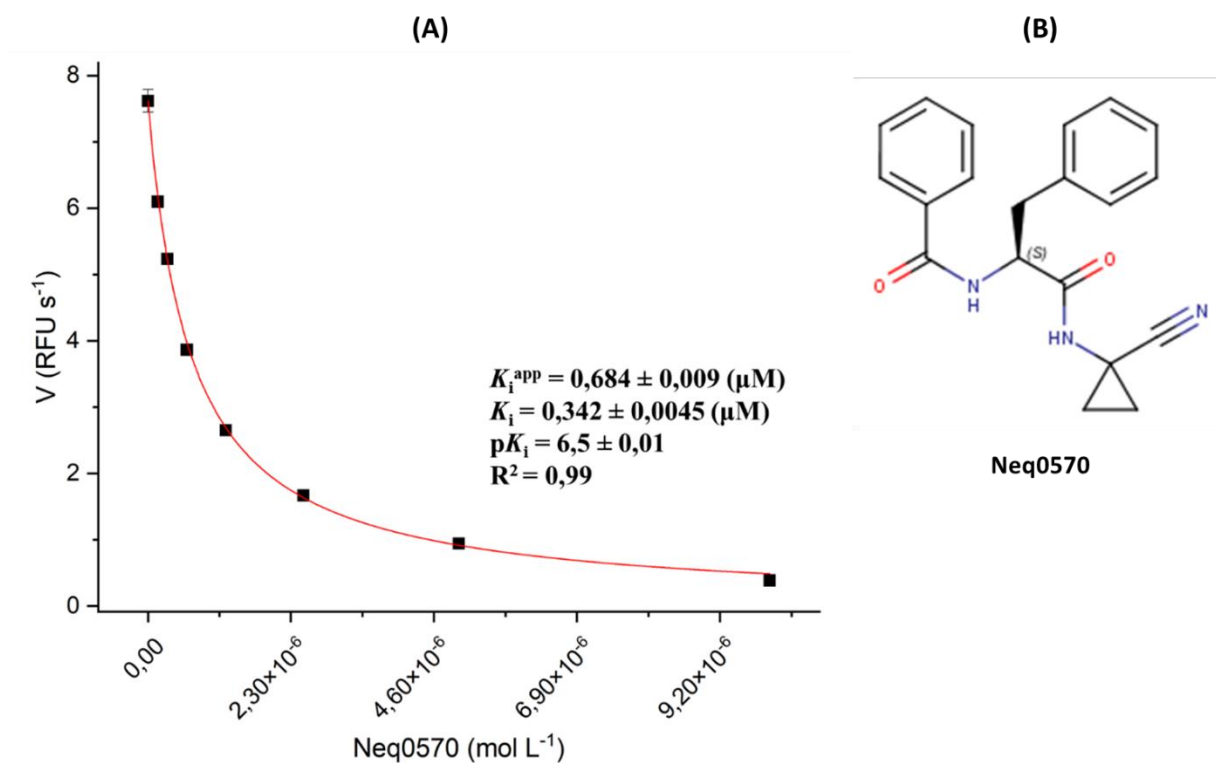
Figura 8. Mecanismo de inibição competitiva



Fonte: Nelson, David L.; Cox, Michael M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 6 ed., p. 208. Porto Alegre: Artmed, 2014

Quanto maior a afinidade do composto pela enzima, menor será o sinal de fluorescência observado. A curva de inibição foi plotada a partir dos sinais de fluorescência (RFU s⁻¹) em função da concentração dos compostos estudados (mol L⁻¹), como demonstrado na Figura 9 para o composto de controle Neq0570.

Figura 9. Curva de inibição obtida para o composto de controle Neq0570 contra a cruzaina, na presença do substrato Z-Phe-Arg-AMC (A) e sua estrutura molecular (B)



Fonte: Elaborada pela autora.

A constante de inibição aparente (K_i^{ap}) foi calculada mediante o ajuste não linear dos dados, aplicando-se a equação (5), descrita abaixo.

$$v_s = \frac{v_o}{1 + \frac{[I]}{K_i^{ap}}} \quad (5)$$

Onde v_s é a velocidade do estado estacionário, v_o é a velocidade na ausência de inibidor e $[I]$ é a concentração do inibidor. Então, a constante K_i foi calculada através da equação (2) e convertida em pK_i pela equação (3). Os compostos selecionados para os ensaios de inibição enzimática com a cruzaina e seus respectivos valores de pK_i estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Inibidores testados e seus respectivos valores de pK_i e % inibição

Composto	pK_i	% Inibição
----------	--------	------------

Neq0570	6,5 ± 0,01	-
Neq1107	5,5 ± 0,12	-
Neq1108	5,7 ± 0,11	-
Neq1109	5,7 ± 0,09	-
Neq1110	5,4 ± 0,06	-
Neq1118	6,3 ± 0,05	-
Neq1119	7,6 ± 0,01	-
Neq1120	6,3 ± 0,03	-
Neq1122	5,7 ± 0,02	-
Neq1123	6,7 ± 0,09	-
Neq1124	5,6 ± 0,06	-
Neq1130	5,7 ± 0,08	-
Neq1131	6,8 ± 0,02	-
Neq1132	6,9 ± 0,06	-
Neq1133	6,8 ± 0,08	-
Neq1134	5,7 ± 0,08	-
Neq1135	5,4 ± 0,11	-
Neq1136	7,8 ± 0,03	-
Neq1137	5,9 ± 0,10	-
Neq1138	5,4 ± 0,05	-
Neq1139	6,9 ± 0,08	-
Neq1141	8,5 ± 0,02	-
Neq1142	7,1 ± 0,08	-
Neq1143	5,5 ± 0,20	-
Neq1144	-	75,5%
Neq1146	5,6 ± 0,02	-
Neq1147	5,9 ± 0,05	-
Neq1148	6,9 ± 0,02	-
Neq1164	4,7 ± 0,02	-
Neq1165	-	90%
Neq1167	7,4 ± 0,06	-
Neq1168	6,7 ± 0,01	-
Neq1170	-	> 95%
Neq1171	7,9 ± 0,02	-
Neq1172	7,1 ± 0,01	-
Neq1174	6,7 ± 0,01	-
Neq1183	-	91,7%
Neq1184	4,9 ± 0,02	-

*Os compostos estudados foram sintetizados pelo grupo NEQUIMED/IQSC/USP

As atividades inibitórias dos inibidores que apresentaram um valor de pK_i abaixo de 5 foram representadas em percentual de inibição, descrito pela equação (6).

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{velocidade da reação na presença do inibidor}}{\text{velocidade da reação na ausência do inibidor}} \times 100\% \quad (6)$$

Os inibidores estudados neste trabalho baseiam-se na estrutura do Neq0570, possuindo mesmo *warhead* (grupo reativos que auxiliam na interação entre o inibidor e os resíduos presentes no sítio catalítico da enzima) que é o grupamento nitrila. Este grupo representa uma importante classe de *warhead*, por apresentar baixo peso molecular e ser metabolicamente estável e polar. Compostos contendo nitrilas como grupos *warhead* demonstram atividade inibitória e seletividade contra cisteíno proteases, por realizarem ligações covalentes reversíveis com o grupo tiol presente no resíduo Cys.

A afinidade do inibidor para a enzima alvo é diretamente proporcional ao valor de pK_i . Ou seja, quanto maior o pK_i , maior será a afinidade do composto para a cruzaina. O composto Neq1141 ($pK_i = 8,5 \pm 0,02$) foi o inibidor mais potente dentre os compostos testados frente à cruzaina. O potencial inibitório dos compostos Neq1119, Neq1123, Neq1131, Neq1132, Neq1133, Neq1136, Neq1139, Neq1141, Neq1142, Neq1148, Neq1167, Neq1168, Neq1171, Neq1172 e Neq1174 excedeu ao potencial apresentado pelo composto de controle (Neq0570; $pK_i = 6,5 \pm 0,01$); sendo assim, tais compostos foram considerados inibidores fortes e eficientes.

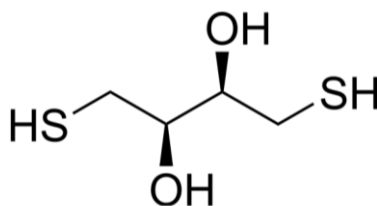
Por outro lado, os compostos Neq1107, Neq1108, Neq1109, Neq1110, Neq1118, Neq1120, Neq1122, Neq1124, Neq1130, Neq1134, Neq1135, Neq1137, Neq1138, 1143, Neq1144, Neq1146, Neq1147, Neq1164, Neq1165, Neq1183 e Neq1184 apresentaram valores de pK_i abaixo de 6, demonstrando uma menor afinidade pela cruzaina e níveis mais baixos de atividade inibitória. Enquanto, o composto Neq1170 (percentual de inibição maior que 95%) foi o inibidor mais fraco dentre os compostos estudados, visto que seriam necessárias maiores concentrações deste para a inibição da enzima alvo.

4.3 Estudo da Importância do DTT em Reações Enzimáticas

O ditiotreitol (DTT) – representado na Figura 10 –, também conhecido como reagente de Cleland, é um potente agente redutor utilizado em diversas aplicações na bioquímica, como

na redução de pontes dissulfeto e desnaturação de proteínas para a análise de eletroforese SDS-PAGE. Na biologia molecular o DTT é amplamente explorado como um agente estabilizador de enzimas, podendo ser encontrado em tampões – fornecidos comercialmente – de reação e armazenamento de muitas enzimas modificadoras de DNA.²⁹

Figura 10. Estrutura molecular do DTT



Fonte: Domínio público, site MedChemExpress.³²

As cisteíno proteases possuem uma tríade Cys-His-Asn no sítio ativo. E a principal função do DTT na biologia molecular é impedir a formação de ligações dissulfeto entre os resíduos de cisteína, colaborando na manutenção da atividade da enzima.³⁰ Assim, foi realizado um estudo com o intuito de avaliar a importância do DTT na estabilização da cruzaína. Para tal finalidade, foram realizados cinco ensaios de inibição enzimática com o composto padrão (Neq0570), como descrito no tópico 3.2.1.1, variando-se a concentração do DTT como descrito na Tabela 5.³¹

Tabela 5. Resultados obtidos na avaliação da atividade enzimática da cruzaína variando-se a concentração de DTT

DTT (mM)	pK _i
0	3,7 ± 0,13
1	6,0 ± 0,07
4	6,6 ± 0,01
5	6,6 ± 0,01
8	6,5 ± 0,06

Fonte: Elaborada pela autora.

Como apresentado na Tabela 5, sob as concentrações 0 mM e 1 mM de DTT os valores de pK_i estão abaixo do ideal para o composto padrão (pK_i entre 6,5 e 6,7), logo pode-se concluir que em baixas concentrações de DTT a cruzaína não apresentava 100% de atividade catalítica, uma vez que a capacidade deste agente de reduzir a oxidação da amostra de proteína foi

diminuída, afetando a atividade enzimática. Enquanto, sob concentrações mais altas de DTT a atividade da cruzaína foi preservada sendo possível obter valores de pK_i para o composto padrão (Neq0570) dentro da faixa ideal.

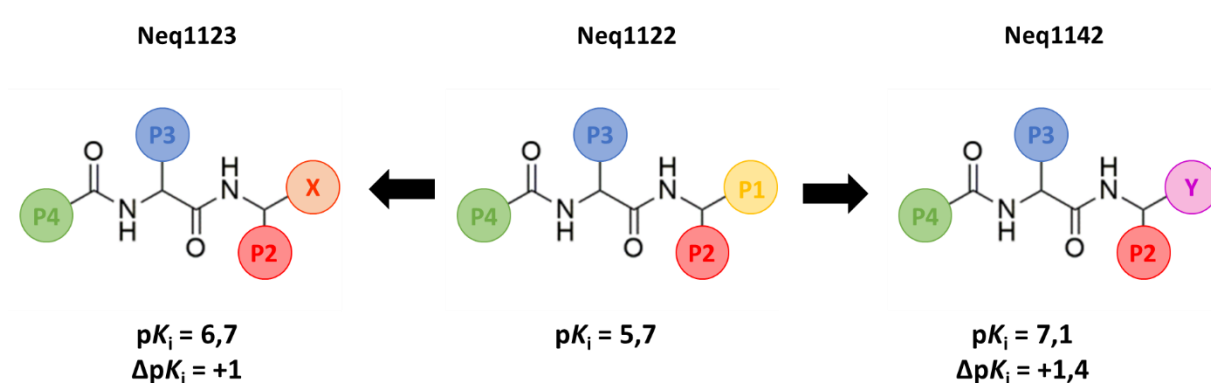
4.4 Estudo da Relação Estrutura-Atividade

Baseando-se nos valores obtidos de pK_i , os compostos testados foram analisados a fim de estabelecer relações entre estrutura e atividade. Tal estudo é extremamente relevante para a compreensão do comportamento do inibidor perante à enzima alvo.

As séries estudadas foram determinadas através da similaridade química, sendo selecionados compostos com o núcleo comum e, então, realizada uma análise de pares moleculares combinados (do inglês, *matched molecular pair analysis*, MMPA).

No presente trabalho, a análise de MMPA/SAR levou em consideração a diferença de afinidade relacionada à uma alteração estrutural, tal diferença é dada por ΔpK_i (calculado pela diferença de afinidade entre duas moléculas). Sendo que valores superiores a 1 unidade logarítmica ($\Delta pK_i > 1$) foram considerados significativos para a afinidade.^{33,34} A análise de pares moleculares combinados foi realizada para o Neq1122 com dois compostos, o Neq1123 e o Neq1142. A Figura 11 apresenta os dados referentes à diferença de afinidade dos compostos em termos de ΔpK_i .

Figura 11. Análise de MMPA do Neq1122 com dois compostos e seus respectivos valores de ΔpK_i , perante à cruzaína



*As estruturas dos compostos estão sob propriedade intelectual e serão divulgadas após patente.

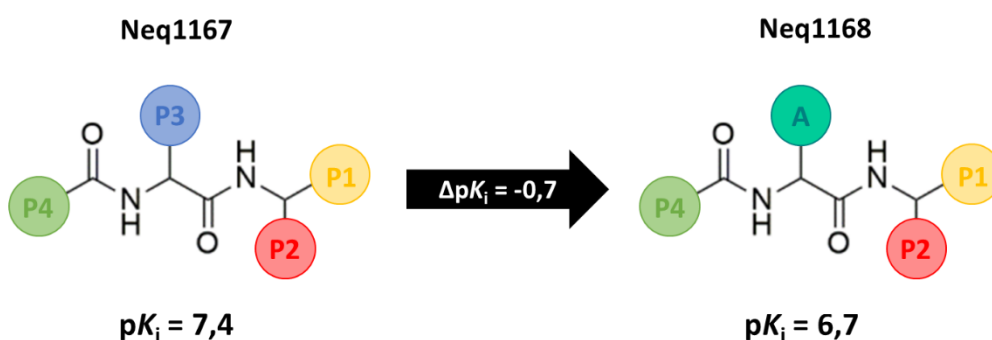
Fonte: Elaborada pela autora.

As modificações estruturais foram realizadas em apenas uma posição (P1) do composto Neq1122. A alteração estrutural na posição P1, observada para o par Neq1122 e Neq1142, substituindo o acetato de metila pelo grupo oxima (Y) levou a um ganho de 1,4 unidades logarítmicas de afinidade para a cruzaina. Assim como observado anteriormente, a modificação estrutural em P1, substituindo o acetato de metila pelo grupo N-O-CH₃ (X) levou a um ganho significativo de 1 unidade logarítmica de afinidade para a cruzaina.

Isso foi observado porque ambos os grupamentos substituídos na posição P1 apresentam menor eletrofilicidade, sendo capazes de realizar interações reversíveis mais fortes com a espécie nucleofílica (cisteína catalítica) presente no sítio ativo da enzima alvo. Sendo que o composto Neq1142 apresentou a maior afinidade com a cruzaina devido, possivelmente, a interações de ligação de H como os resíduos nucleofílicos de aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima. Pode-se afirmar que, de modo geral, os grupos substituídos devem interagir de forma mais efetiva com os aminoácidos no subsítio da proteína, e esse ganho de afinidade deve-se, possivelmente, à um melhor encaixe do grupamento no subsítio.

Em seguida, foi realizada a análise de pares moleculares combinados para o Neq1167 com apenas um composto, o Neq1168. A Figura 12 apresenta os dados referentes a diferença de afinidade dos compostos em termos de ΔpK_i , tendo como alvo a enzima cruzaina.

Figura 12. Análise de MPPA do Neq1167 com o Neq1168 e o valor de ΔpK_i correspondente à modificação estrutural na posição P3, tendo como alvo a cruzaina



*As estruturas dos compostos estão sob propriedade intelectual e serão divulgadas após patente.

Fonte: Elaborada pela autora.

A modificação estrutural na posição P3, onde o grupamento isopropil foi substituído pela fenila (A), levou à uma perda de 0,7 unidades logarítmicas de afinidade para a cruzaina.

Essa perda de afinidade pode estar relacionada com a mudança estrutural de um grupo Leu para o grupo Phe, que provavelmente não se adapta tão bem ao sítio ativo da enzima.

E por fim, foi realizada a análise de pares moleculares combinados para o Neq1183 com o Neq1184. Os dados referentes à esta análise estão apresentados na Figura 13.

Figura 13. Análise de MMPA do Neq1183 com o Neq1184 e o valor de ΔpK_i correspondente a modificação estrutural na posição P1, tendo como alvo a cruzaína



*As estruturas dos compostos estão sob propriedade intelectual e serão divulgadas após patente.

Fonte: Elaborada pela autora.

Observa-se que a modificação estrutural na posição P1, onde o 1,1-dimetilciclopropano foi substituído pela metila (B), levou a um ganho de 0,9 unidades logarítmicas de afinidade para a cruzaína.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliado o potencial inibitório de uma série de compostos frente à enzima cruzaína. Para isto foi realizada a expressão e purificação da enzima alvo, de acordo com o protocolo utilizado pelo grupo NEQUIMED/IQSC/USP (descrito no item 3.1. de Materiais e Métodos). Uma vez purificada, a cruzaína foi avaliada em relação à sua atividade através de ensaios cinéticos para a determinação da constante de Michaelis-Menten.

Os resultados obtidos para a constante de Michaelis-Menten (K_M) foram satisfatórios, apresentando valores condizentes com os descritos em literatura (variando de 1 a 5,2 μM). Além disso, no ponto de vista prático, os baixos valores de K_M indicam uma alta afinidade da cruzaína pelo substrato Z-FR-AMC e uma ótima taxa de conversão do substrato em produto.

Após a avaliação dos parâmetros cinéticos, foram realizados os ensaios de inibição enzimática para a obtenção dos valores de K_i^{ap} (constante de inibição aparente) dos inibidores testados. Os resultados obtidos foram tratados e convertidos em termos de logaritmo ($\text{p}K_i$). A avaliação do potencial inibitório dos compostos considerou o valor do $\text{p}K_i$ do composto padrão (Neq0570; $\text{p}K_i = 6,5 \pm 0,01$). Os compostos que apresentaram valores de $\text{p}K_i$ acima de 6,5 foram considerados potenciais inibidores de cruzaína, sendo que o composto Neq1141 ($\text{p}K_i = 8,5 \pm 0,02$) foi o inibidor mais eficiente dentre os compostos testados frente à cruzaína. Enquanto, os compostos que apresentaram valores de $\text{p}K_i$ abaixo de 5 foram considerados fracos inibidores, visto que apresentaram uma menor afinidade pela enzima alvo.

Através da variação de alguns parâmetros – como pH, temperatura e DTT – dos ensaios de inibição enzimática foram estudadas a estabilidade da cruzaína expressa e a importância do DTT na manutenção da atividade enzimática. E, observou-se que a cruzaína apresenta ótima atividade sob baixa temperatura e em meio levemente ácido, como destacado nas Tabelas 1 e 2, os resultados obtidos para o $\text{p}K_i$ do composto padrão (Neq0570) nos ensaios em que a ativação da proteína foi feita em banho de gelo e no tampão acetato ($\text{pH} = 5,5$) estavam dentro da faixa de 6,5 – 6,7. Assim como, foi demonstrado que a ativação da enzima ocorre de maneira mais eficiente sob concentrações de DTT em torno de 5 mM, onde o agente apresenta a capacidade de reduzir de maneira mais eficiente a oxidação da amostra de proteína, mantendo a atividade enzimática específica.

Além disso, foi realizado um estudo da relação estrutura-atividade de uma série de compostos. No qual, através de uma abordagem por MMPA, foi realizada uma correlação entre a modificação estrutural efetuada no composto e a diferença de afinidade dada por $\Delta\text{p}K_i$.

Verificou-se que a alteração de determinados grupos funcionais em determinados compostos culminou em um ganho de afinidade, como o observado na transformação do Neq1122 para o Neq1142.

No geral, este trabalho forneceu informações quantitativas sobre diferentes inibidores covalentes reversíveis com alta afinidade para a cruzaina, que está envolvida em todos os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. Tais informações são importantes para o aprofundamento do estudo e desenvolvimento de novos fármacos baseados na inibição de enzimas, como as cisteíno proteases.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. VALVERDE, R. Doenças Negligenciadas. **Agência FIOCRUZ de Notícias**, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>>. Acesso em: 25 de maio de 2023.
2. AMARAL, A. T., ANDRADE, C. H., KÜMMERLE, A. E., GUIDO, R. V. C. A evolução da Química Medicinal no Brasil: avanços nos 40 anos da Sociedade Brasileira de Química. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 694-700, 2017.
3. Folheto informativo da Organização Mundial da Saúde (OMS), 2023. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 25 de maio de 2023.
4. Doença de Chagas. **Medecins San Frontieres / Médicos Sem Fronteiras**, 2018. Disponível em: <<https://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicas/doenca-de-chagas>>. Acesso em: 20 de abril de 2023.
5. DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23 (suppl 1), p. S13-S22, 2007.
6. FERREIRA, A. M., *et al.* Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. **Cad. Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p. 354-362, 2019.
7. CANÇADO, J. R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652002000100006>>. Acessado em: 23 de junho de 2023.
8. PONTES, V. M. O. DE, *et al.* (2010). Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, v. 43, n. 2, p. 182–187. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000200015>>. Acessado em: 23 de junho de 2023.
9. MENEZES, J. C. L., *et al.* Synthesis and Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Diaryldiazepines. **Molecules**, v. 20, p. 43-51, dezembro de 2014.
10. COPELAND, R. A. Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Phamacologists. 2. ed. Estados Unidos: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

11. DOYLE, P. S., *et al.* The Trypanosoma cruzi Protease Cruzain Mediates Immune Evasion. **Plos Pathogens**, v. 7, n. 9, 2011.
12. MCGRATH, M. E., *et al.* The Crystal Structure of Cruzain: A Therapeutic Target for Chagas' Disease. **Journal of Molecular Biology**, v. 247, p. 251-259, 1995.
13. VARGA-MÉNDEZ, L. Y., KOUZNETSOV, V. Cruzain Inhibitors as Prominent Molecules with The Potencial to become Brug Candidates Against Chagas Disease. **Journal of Phamacology and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 3, 2019.
14. Crystal structure of cruzain with nitrile inhibitor N-(2-AMINOETHYL)-NALPHA-BENZOYL-L-PHENYLALANINAMIDE (PDB ID 4QH6). **RCSB PDB**. Disponível em: <<https://doi.org/10.2210/pdb4QH6/pdb>>. Acesso em: 20 jun. de 2023.
15. FARADY, C. J., CRAIK, C. S. Mechanisms of macromolecule protease inhibitors. **ChemBioChem [S.I.]**, v. 11, n. 17, p. 2341-2346, 2010.
16. GILLMOR, S. A., CRAIK, C. S., FLETTERICK, R. J. Structural determination of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, v. 6, n. 8, p. 1603-1611, 1997.
17. SOUZA, M. L., *et al.* Triagem virtual de candidatos a novos inibidores da enzima cruzaina de Trypanosoma cruzi. **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0558-1.pdf>>. Acessado em: 19 de junho de 2023.
18. COURA, J. R., VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, Chagas Disease Outlook, p.56-57, junho de 2010.
19. URBINA, J. A. New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 13, n. 5, p. 661– 669, 2003.
20. LIEBERMAN, M., MARKS, A.D., Smith, C.M. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach, 3rd ed. **Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins**, Philadelphia, 2009.
21. ROGERS, K.E.; *et al.* Novel Cruzain Inhibitors for the Treatment of Chagas' Disease. **Chem Biol Drug Des**, v. 80, n. 3, p. 398–405, 2012.
22. ROCHA, D. A., *et al.* Synthesis and structure-activity relationship studies of cruzain and rhodesain inhibitors. **Eur J Med Chem**, setembro de 2018, v. 5, n. 157, p. 1426-1459. Disponível em: <[10.1016/j.ejmech.2018.08.079](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.08.079)>. Acessado em: 21 de junho de 2023.
23. Estrutura molecular do composto K777. **Site MedChemExpress (MCE)**. Disponível em: <<https://www.medchemexpress.com/k777.html>>. Acessado em: 20 de junho de 2023.

24. ARROIO, A., HONÓRIO, K. M., & Silva, A. B. F. da. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova** (2010), v. 33, n. 3, p. 694–699. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300037>>. Acessado em: 22 de junho de 2023.
25. ALVES, V. M. et al. QUIMIOINFORMÁTICA: UMA INTRODUÇÃO. **Química Nova** [online]. 2018, v. 41, n. 2, p. 202-212. Disponível em: <<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170145>>. Acessado em: 1 de julho de 2023.
26. YANG, Z., *et al.* Matched Molecular Pair Analysis in Drug Discovery: Methods and Recent Applications. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2023, v. 66, p. 4361-4377. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jmedchem.2c01787?ref=pdf>>. Acessado em: 1 de julho de 2023.
27. NELSON, D. L., COX, M. M. Princípios da Bioquímica de Lehninger, 6 ed., pp. 203- 205; Porto Alegre: **Artmed**, 2014.
28. BRENDA Enzyme Database. Disponível em: <<https://www.brenda-enzymes.org/>>.
29. FJELSTRUP, S., *et al.* The Effects Of Dithiothreitol on DNA. **Sensors**, v. 17, n. 1201, p. 2, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390%2Fs17061201>>. Acessado em: 24 de junho de 2023.
30. VERMA, S., DIXIT, R., PANDEY, K. C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **Front. Pharmacol.**, v. 7, n. 107, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00107>>. Acessado em: 24 de junho de 2023.
31. Cleland, W. W. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. **Biochemistry**, v. 3, n. 4, p. 480-482, abril de 1964. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/bi00892a002>>. Acessado em: 25 de junho de 2023.
32. Estrutura molecular DTT. Site MedChemExpress (MEC). Disponível em: <<https://www.medchemexpress.com/DTT.html>>. Acessado em: 1 de julho de 2023.
33. CIANNI, L., *et al.* Can Cysteine Protease Cross-Class Inhibitors Achieve Selectivity? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 10497-10525, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00683>>. Acessado em: 14 março de 2023.
34. KRAMER, C., *et al.* Matched molecular pair analysis: significance and the impact of experimental uncertainty. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2014, v. 57, n. 9, p. 3786-802. Disponível em: <[10.1021/jm500317a](https://doi.org/10.1021/jm500317a)>. Acessado em: 23 de junho de 2023.

35. Estrutura molecular Z-Phe-Arg-AMC (Kallikrein substrate). **Site Echelon Biosciences.** Disponível em: <<https://www.echelon-inc.com/product/z-phe-arg-amc-kallikrein-substrate/>>. Acessado em: 1 de julho de 2023.

7 APÊNDICE

Figura 13. Curva de inibição obtida para o composto Neq1141 contra a cruzaína, na presença do substrato Z-Phe-Arg-AMC

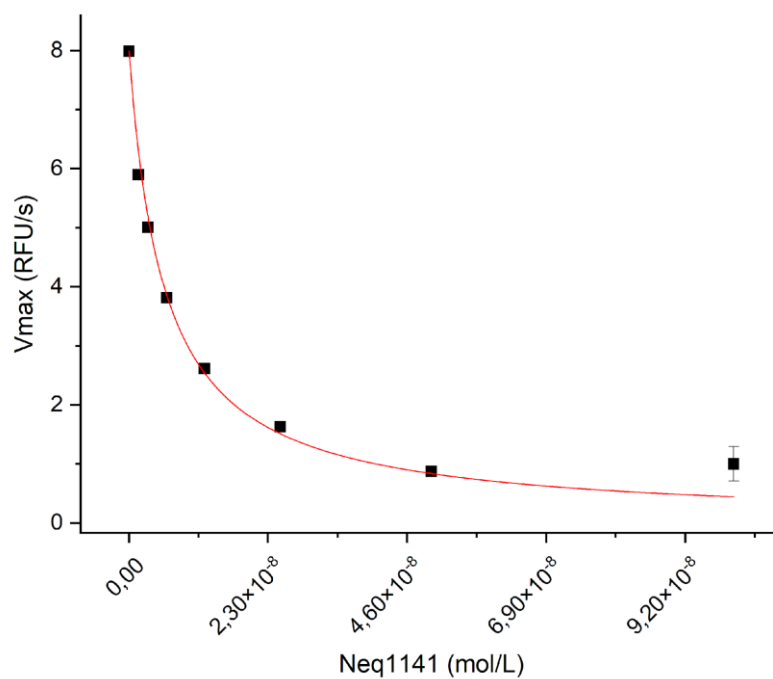


Figura 14. Curva de inibição obtida para o composto Neq1142 contra a cruzaína, na presença do substrato Z-Phe-Arg-AMC

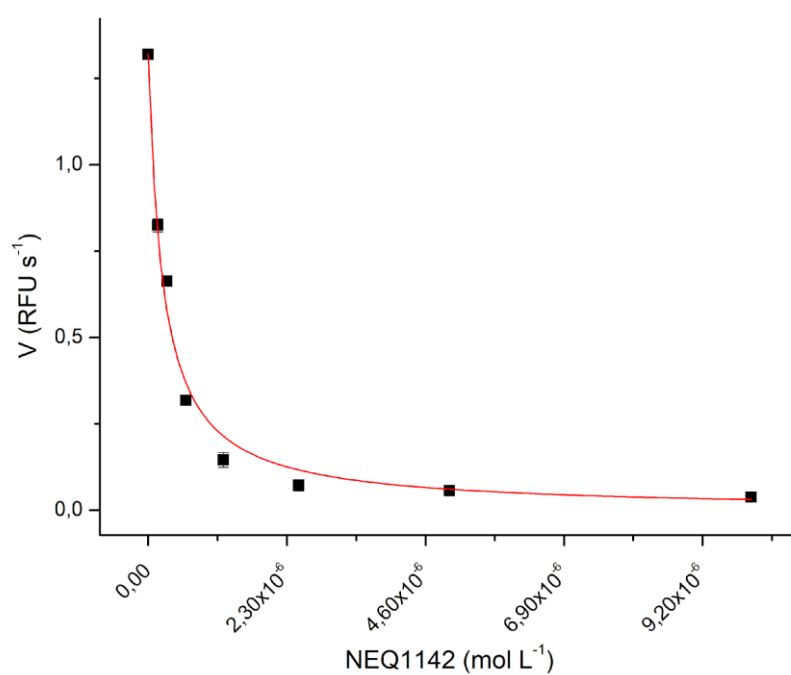


Figura 15. Curva de inibição obtida para o composto Neq1168 contra a cruzaína, na presença do substrato Z-Phe-Arg-AMC

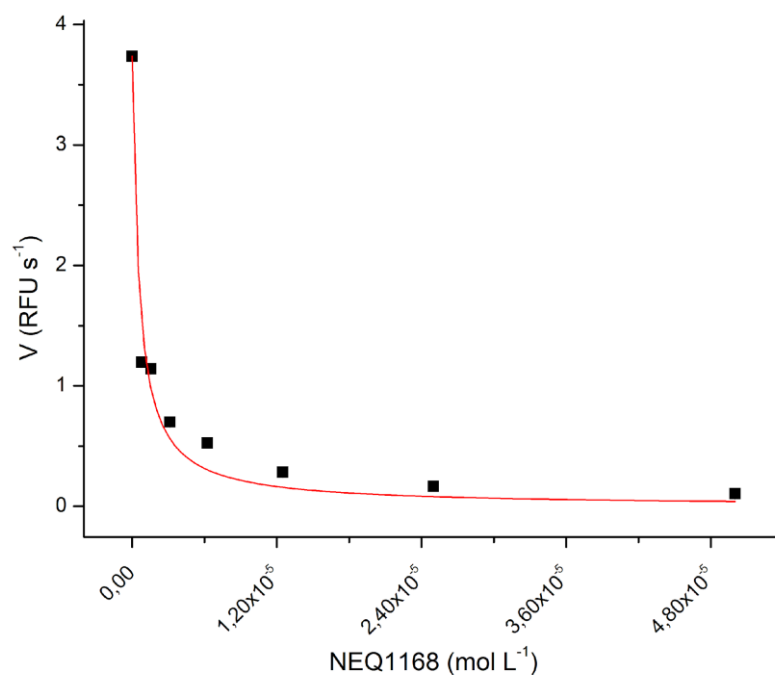
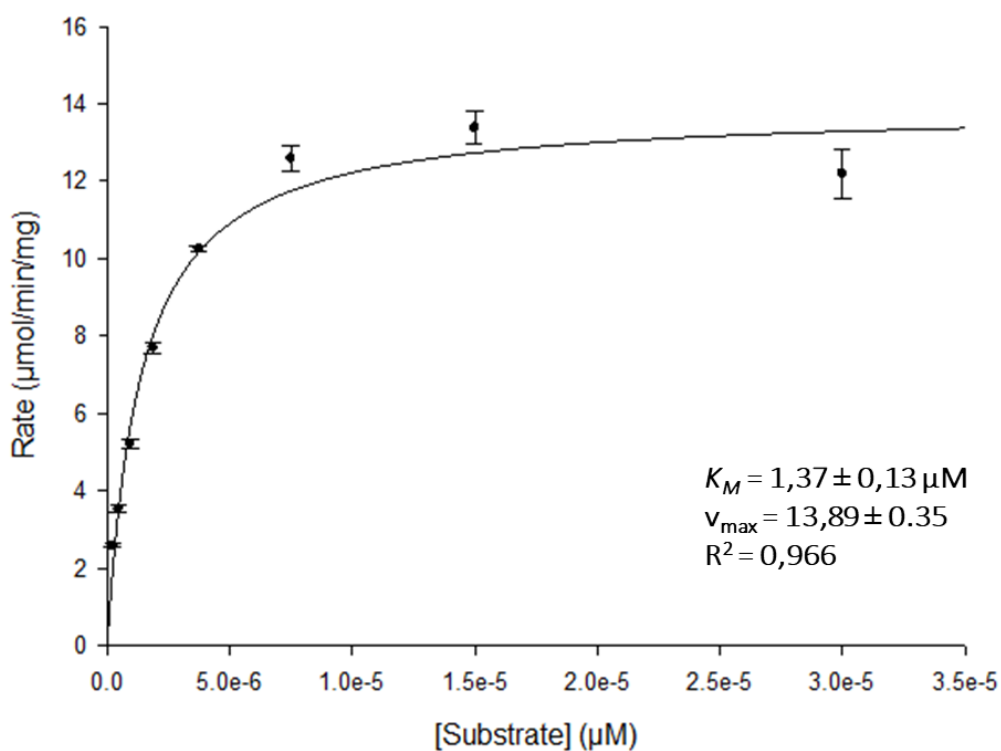


Figura 16. Replicata da curva de velocidade em função da concentração de Z-FR-AMC para o ajuste não-linear da cruzaína na equação de Michaelis-Menten



ANEXO

Monografia_Beatriz Siqueira Ho

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

3% 	3%	2%	0%
ÍNDICE DE SEMELHANÇA	FONTES DA INTERNET	PUBLICAÇÕES	DOCUMENTOS DOS ALUNOS

FONTES PRIMÁRIAS

1	pubs.rsc.org Fonte da Internet	2%
2	www.ncbi.nlm.nih.gov Fonte da Internet	<1%
3	parasitesandvectors.biomedcentral.com Fonte da Internet	<1%
4	cyberleninka.org Fonte da Internet	<1%
5	portal.arid.my Fonte da Internet	<1%