



**Universidade de Brasília
Instituto de Química**



Estudo do Mecanismo de Ação e Desenvolvimento de Medicamentos Tripanocidas

Adão Lincon Bezerra Montel

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: *Kleber Carlos Mundim*

Setembro – 2011

Folha de Aprovação

Dedicatória

Pouco antes do início deste curso de doutorado, conheci uma pessoa muito especial que foi fundamental para a condução de todo o trabalho. Um professor extrovertido com uma visão ímpar da ciência, que considerava a descoberta, e não o reconhecimento, como a principal meta de todo pesquisador. Um homem que enxergava no trabalho uma forma de contribuir com a sociedade, de combater patologias que afligem a humanidade, aumentam a pobreza no mundo e levam vidas preciosas. Uma mente brilhante, cheia de idéias inovadoras e sempre capaz de adicionar contribuições relevantes a quaisquer projetos interessantes. Um colega capaz de conciliar o rigor profissional de um orientador com a empatia de um amigo. O professor Cezar Martins de Sa co-orientou esta tese durante quase todo o tempo de duração da pesquisa. E nos deixou já na conclusão deste trabalho. Sua morte prematura deixou para trás pesquisas incompletas. Não estávamos preparados para sua ausência, meu amigo. Mais do que conhecimento técnico, você me ensinou uma filosofia de vida no seu próprio exemplo.

Descanse em paz querido amigo, protegido eternamente pelo espírito divino. Dedico este trabalho a você. Que esta pequena contribuição científica mantenha viva a memória de alguém que fez tanto por esta Universidade.

Agradecimentos

Meus agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de diversas formas para a conclusão deste trabalho;

Aos meus pais e à minha irmã, por me apoiar mesmo estando tão distante;

Aos colegas Ricardo Camargo, Rafaela Fontenele, Martha Estrela, Alexandre, Breno, Fernando Rangel, Heibbe, Vilma Carolina, Ludmila, Arthur, Cláudio, Gustavo e Josiane que contribuíram tanto discutindo tópicos importantes durante a elaboração do trabalho como auxiliando na execução de tarefas importantes;

Aos professores Fernando Coutinho, Márcia Murta, Inês Resck, Elaine Maia e Marçal pela preciosa colaboração e pelos esclarecimentos oportunos de temas discutidos;

Ao meu orientador, prof.. Dr. Kleber Carlos Mundim, pela disposição, paciência e por todo o apoio;.

Agradeço à pessoa mais corajosa que já conheci, meu primo Wanderson, morto em um acidente aos 28 anos. Pelo exemplo de garra e determinação.

Agradeço especialmente a minha querida esposa Ana Carolina. Com você aprendi que o amor é o complemento da razão. Você tornou esta jornada mais branda, tornou os dias menos amargos. Pesa sobre mim agora o dever de retribuir um sentimento tão profundo e tão belo.

À FAP-DF, ao Laboratório Farmanguinhos, e a UnB, pelo auxílio financeiro e estrutural na execução do projeto;

A todos aqueles a quem a minha memória injustamente excluiu. Que a minha dívida de gratidão com todos vocês possa ser saudada pela nossa amizade;

Resumo

A Doença de Chagas afeta cerca de 18 milhões de pessoas no mundo e é endêmica da América Latina. Devido ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos pelo agente etiológico da doença, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, a busca por novos medicamentos é de fundamental importância. As enzimas histonas deacetilase se mostraram um alvo farmacológico bastante interessante devido ao seu amplo espectro de ação bem como a baixa toxicidade dos inibidores desta enzima ao hospedeiro. Os inibidores da enzima histona deacetilase revelaram atividade importante no combate a diversas moléstias. A descoberta da alta atividade destes compostos contra infecções causadas por protozoários estimulou a busca por moléculas capazes de combater a infecção de células por protozoários. Neste trabalho fizemos uma investigação *in silico* do mecanismo de ação destes inibidores e investigamos a atividade *in vitro* de alguns deles, especialmente análogos borônicos de ácidos graxos de cadeia curta contra a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Em paralelo a esta pesquisa, investigamos também o potencial de uso de medicamentos híbridos, isto é, compostos por dois princípios ativos em uma mesma molécula (anti-inflamatórios não esteroidais e inibidores de histona deacetilase) bem como a atividade do inibidor de transcriptase reversa nevirapina no tratamento da infecção pelo *T. cruzi*. O conjunto da pesquisa revelou um potencial sítio alostérico no mecanismo de ação da histona deacetilase por ácidos graxos de cadeia curta. Os análogos borônicos revelaram baixa atividade com exceção de um dos ésteres testados. O único éster a apresentar atividade, entretanto, apresentou uma toxicidade demasiada inviabilizando um uso farmacológico. A atividade dos medicamentos híbridos também se mostrou baixa. A nevirapina foi ativa contra a forma amastigota intracelular do *T. cruzi*. Este resultado sugere que este medicamento pode ser uma nova droga em potencial para o tratamento da cardiomiopatia da doença de Chagas.

Abstract

Chagas disease affects about 18 million people worldwide and is endemic in Latin America. Due to the development of drug resistance by the causative agent of disease, the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the search for new drugs is very important. The histone deacetylase enzymes proved to be a very interesting pharmacological target due to its broad spectrum of activity and low toxicity of inhibitors of this enzyme to the host. The histone deacetylase inhibitors have shown important activity in combating various diseases. The discovery of high activity of these compounds against infections caused by protozoa stimulated the search for molecules capable of fighting the infection of cells by protozoa. In this work we have done an *in silico* investigation of the mechanism of action of these inhibitors and investigated the *in vitro* activity of some, especially Boronic analogues of short-chain fatty acids against *T. cruzi* infection. In parallel with this research also investigated the potential use of hybrid drugs, i.e. comprising two active ingredients in the same molecule (non-steroidal anti-inflammatory drugs and inhibitors of histone deacetylase) as well as the activity of reverse transcriptase inhibitor nevirapine in the treatment of infection by *T. cruzi*. The survey revealed a number of potential allosteric site on the mechanism of action of histone deacetylase by short-chain fatty acids. Boronic analogs showed low activity with the exception of one of the esters tested. The only activity to produce ester however, showed an excessive toxicity invalidating a pharmacological use. The activity of hybrid drugs was also low. Nevirapine was active against the intracellular amastigote form of *T. cruzi*. This result suggests that this drug may be a potential new drug for treatment to cardiomyopathy of Chagas disease.

Lista de Símbolos e Acrônimos

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

AAS – Ácido Acetil Salicílico

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

COX – Ciclo-oxigenase

HDAC – Histona Deacetilase

HDACi – Inibidor de Histona Deacetilase

NSAID - Inibidor Não Esteroidal da Síntese de Prostaglandina

Bp – Pares de base (*pair base*)

PGHS – Prostaglandina H₂ Sintetase

MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]

NADH - nicotinamida adenina dinucleótido (forma reduzida)

FADH₂ - flavina-adenina dinucleótido (forma reduzida)

D.E.-Dinâmica Estocástica

Sumário

Capítulo 1 Introdução	13
1.1 Revisão bibliográfica	15
1.2 Objetivo Geral.....	16
1.3 Objetivos Específicos	17
Capítulo 2 A Doença de Chagas	19
2.1 O Parasito.....	20
2.2 Tripomastigotas Sanguícolas	23
2.3 Amastigotas Intracelulares	23
2.4 O Ciclo Evolutivo	25
2.5 A Resposta Inflamatória	27
2.6 Lesões Celulares.....	27
2.7 Alterações na Matriz Extracelular	28
2.8 A Doença de Chagas Adquirida	28
2.9 A Quimioterapia da Doença de Chagas	29
Capítulo 3 Epigenética	31
3.1 A Apoptose Celular.....	31
3.2 O ADN Eucarioto e as Proteínas Histonas.	33
3.3 A Enzima Histona Deacetilase	35
3.4 Histonas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
3.5 Inibidores de Histona Deacetilase	38
3.6 Mecanismos de Inibição Enzimática.....	40
Capítulo 4 Ácidos Hidroxâmicos.....	42
Capítulo 5 Ácidos Borônicos.....	46
Capítulo 6 Fundamentos Teóricos da Simulação Computacional	50
6.1 A Teoria do Funcional da Densidade (DFT)	50
6.1.1 Os Teoremas de Hohenburg-Kohn.....	54
6.1.2 A Carga ChelpG	55
6.2 Dinâmica Estocástica	56
6.3 O Campo de Força OPLS.....	62
6.4 Validação do Método (critérios de convergência).....	64
6.5 Modelo de Solvente	65
6.5.1 Mecânica Molecular.....	65
6.5.2 Cálculo ab initio	66
Capítulo 7 Avaliação da atividade tripanocida dos ácidos borônicos de cadeia curta.....	68
7.1 Metodologia de Avaliação da Atividade Tripanocida (ensaios <i>in vitro</i>)	68
7.1.2 Ensaio MTT	69
7.1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
7.1.4 Células L6.....	69
7.1.5. Manutenção das culturas.....	69
7.1.6. Células L6.....	70
7.2 Infecção com <i>T. cruzi</i> das monocamadas de células L6 para ensaios de Imunofluorescência	70
7.2.1 Em lamínulas.....	70
7.2.2 Microscopia Eletrônica.....	71
7.5 Resultados dos Ensaios <i>In Vitro</i>	72

7.5.1 Atividade tripanocida	72
7.5.2. Microscopia eletrônica	72
7.6 Ensaio de citotoxicidade	73
7.7 O desvio no ensaio MTT e o composto borônico ativo	75
Capítulo 8 Metodologia da Simulação Computacional	80
8.1 Mecânica Molecular	80
8.2 Método ab initio	83
Capítulo 9 Resultados da Simulação Computacional dos Ácidos Borônicos	85
9.1 A inatividade nos ensaios <i>in vitro</i> dos compostos borônicos	93
Capítulo 10 Estudo do mecanismo de inibição da histona deacetilase por ácidos graxos de cadeia curta	96
10.1 A homologia entre as histonas	96
10.2 O Sítio Ativo da Histona Deacetilase	98
Capítulo 11 Os Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (NSAID)	116
11.1 A Biossíntese de Prostaglandinas e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	119
11.2 Medicamentos Híbridos	120
11.3 Metodologia	121
11.4 Resultados	123
11.4.1 RMN-H ¹ (ácido butil-salicílico)	123
11.4.2 Resultados da atividade <i>in vitro</i>	124
Capítulo 12 Avaliação dos compostos hidroxâmicos	126
12.1 Síntese dos compostos Hidroxâmicos	130
Capítulo 13 Estudos sobre a Nevirapina	132
13.1 Avaliação da atividade tripanocida	132
13.2 Estudos <i>in silico</i> sobre a atividade de análogos da nevirapina contra	137
a AIDS	137
13.3 Resultados	142
Capítulo 14 Conclusões	145
Capítulo 15 Perspectivas	148
16. Referências Bibliográficas	149

Lista de Tabelas

Tabela 1 Tratamento recomendado para a doença de Chagas.....	31
Tabela 2 Tipos de histonas.....	34
Tabela3. Resultado das interações dos inibidores com a proteína.....	89
Tabela 4. Valores das distâncias entre os átomos.....	91
Tabela 5. Homologia Sequencial de Enzimas HDAC.....	95
Tabela 6. Valores de energia interação eletrostática e de Van der Walls obtidos pela dinâmica estocástica dos compostos.....	102
Tabela 7. Valores de energia de interação de ácido carboxílicos de cadeia curta.....	109
Tabela 8. Comparação entre os resultados experimentais, os resultados de dinâmica estocástica considerando a inibição competitiva e resultados da dinâmica considerando o sítio ativo e o alostérico.....	111
Tabela.9 Energia de interação dos análogos hidroxâmicos calculados por dinâmica estocástica.....	126
Tabela.10 Comparação entre a energia do HOMO e LUMO dos inibidores e do cátion de zinco.....	127
Tabela.11 Valores de energia dos orbitais de Fronteira HOMO e LUMO.....	129
Tabela12. Valores de energia de interação obtidos pela dinâmica estocástica	143

Lista de Figuras

Figura 1 Fluxograma do trabalho de pesquisa apresentado	18
Figura 2 Estrutura da célula do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3 Estrutura do <i>T. cruzi</i> tripomastigota.....	21
Figura 4 Estrutura do <i>T. cruzi</i> epimastigota.....	22
Figura 5 Estrutura do <i>T. cruzi</i> promastigota	22
Figura 6 Estrutura do <i>T. cruzi</i> amastigota.....	22
Figura 7 Ciclo biológico do <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
Figura 8 Estruturas moleculares do Nifurtimox e do Benzonidazol	30
Figura 9 Estrutura do nucleossomo.....	35
Figura 10 Mecanismo de acetilação da Histona pela histona acetil transferase.....	36
Figura 11 Desacetilação da cadeia lateral da lisina na proteína histona promovida pela enzima Histona Deacetilase	37
Figura 12 Estrutura da Apicidin	40
Figura 13 Formas tautoméricas do ácido hidroxâmico	42
Figura 14 Análogos do ácido butírico sem atividade sobre a HDAC ou com atividade reduzida	44
Figura 15 Análogos do ácido butírico com atividade igual ou superior sobre a HDAC.....	45
Figura 16 Estrutura do Bortezomib.....	46
Figura 17 “Ponte N-B” no aduto do ácido fenil-borônico com a dietanolamina.....	47
Figura 18 O caráter ácido de Lewis dos ácidos borônicos	47
Figura 19 Ésteres borônicos testados quanto a sua atividade tripanocida.....	68
Figura 20 Algumas características típicas de apoptose observadas no <i>T cruzi</i> na presença do éster borônico.....	73
Figura 21 Placas com cultura de células cardíacas de camundongos	74
Figura 22 Placa com cultura e corante para a espectroscopia	74
Figura 23 Absorbância versus concentração dos ésteres borônicos.....	75
Figura 24 Reação de redução do corante MTT	76
Figura 25 Citotoxicidade e número de células viáveis na cultura tratada com éster catecol propilborônico.....	77
Figura 26 Imagens da microscopia de fluorescência.....	78
Figura 27 Imagens da microscopia de fluorescência.....	79
Figura 28 Determinação da geometria de partida dos ácidos carboxílicos a partir do ácido hidroxâmico.....	81
Figura 29 Determinação da geometria de partida dos ácidos carboxílicos a partir do ácido hidroxâmico.....	81
Figura 30 Escolha da geometria de partida dos ácidos carboxílicos de cadeia curta no sítio vicinal.....	82
Figura 31 Geometria de partida adotada nas otimizações ab initio	84
Figura 32 Gráficos da relação entre a Energia Total e o número de iterações para os ácidos carboxílicos de cadeia curta demonstrando a convergência das simulações.....	86
Figura 33. Gráficos demonstrando a relação energia cinética, potencial e total em relação ao tempo. Também é apresentado o gráfico da temperatura em relação ao tempo. Em todos os casos, os valores convergem após cinco nanossegundos.....	87

Figura 34 Geometrias finais obtidas nos cálculos de dinâmica estocástica das espécies químicas estudadas. A-Butirato; B-Propilboronato; C-Butilboronato; D-Alilboronato; E-Ciclopropilvinilboronato	89
Figura 35. Representação das distâncias inter-atômicas obtidas nas geometrias finais das simulações.....	92
Figura 36 Mecanismo proposto para a degradação de ácidos borônicos nos organismos vivos.	93
Figura 37 Mecanismo proposto da deboronação oxidativa	94
Figura 38 Intermediário proposto na enzima P450.....	94
Figura 39. Comparação entre as estruturas das HDACs.	97
Figura 40 Comparação entre as estruturas da HDAC humana (em azul) e a HDAC bacteriana da <i>Alcaligenaceae bacterium</i>	97
Figura 41 Sítio ativo da histona deacetilase (PDB 1T67).	99
Figura 42 Estrutura do sítio ativo.....	101
Figura 44 Geometria otimizada. A- Acetato; B-Propanoato; C-butirato ; D-Pentanoato; E-Hexanoato	104
Figura 45 representação do sítio vicinal da histona deacetilase.....	106
Figura 46 Representação da interação do ácido butírico no sítio ativo e no sítio vicinal.....	107
Figura 47 Relação entre energia e número de iterações para as minimizações de energia das estruturas contendo os inibidores ácidos carboxílicos de cadeia curta no sítio ativo e vicinal.	108
Figura 48 Geometria otimizada das estruturas com interação simultânea no sítio ativo e vicinal. A-Acetato; B-Propanoato; C- Butirato; D- Pentanoato; E-Hexanoato.....	112
Figura 49 Esquema da Biossíntese de Prostaglandinas	117
Figura 50 Mecanismos de acetilação da COX pelo ácido acetil salicílico	118
Figura 51 Metabolismo do acetoaminofenol	119
Figura 52 Síntese do ácido butil salicílico.....	121
Figura 53 Síntese de Tributirina	122
Figura 54 Resultado das atividades das microemulsões.....	125
Figura 55 Geometrias finais da otimização de geometria dos compostos hidroxâmicos.....	128
Figura 56 Geometria otimizada dos inibidores com Zn ²⁺ (em solvente)..	130
Figura 57 Estrutura da nevirapina	132
Figura 58 Culturas de <i>T.cruzi</i> e <i>L.chagasi</i> nas formas epimastigota contendo nevirapina no meio.....	133
Figura 59 Imagens da microscopia CONFOCAL de células L6 infectadas com <i>T. cruzi</i> com diferentes concentrações de nevirapina.	134
Figura 60 Contagem de número de parasitas intracelulares	135
Figura 61 1= estrutura da 12-hidroxinevirapina, 2 = estrutura da nevirapina metídeo quinona	136
Figura 62 Estruturas do AZT e do 3TC.....	140
Figura 63 À esquerda, otimização de geometria resultante de cálculo por mecânica molecular e, à direita, otimização de geometria resultante de cálculo ab initio.	142

Capítulo 1

Introdução

Neste trabalho, estudamos a atividade tripanocida e o mecanismo de ação de alguns inibidores sobre o protozoário *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico responsável pela doença de Chagas. Investigamos inicialmente a atividade de inibidores da histona deacetilase e de inibidores da ciclooxigenase contra o protozoário *T. cruzi*. Vários outros compostos foram testados também sendo que o inibidor da transcriptase reversa ('nevirapina') revelou uma atividade importante sobre uma das formas do *T. cruzi*. Em nosso trabalho, investigamos também, por meio de simulação, o mecanismo teórico de atividade de um dos inibidores da histona deacetilase, cujas evidências teóricas sugerem uma participação alostérica no mecanismo de inibição. Também pesquisamos *in silico* potenciais inibidores para esta enzima visto que os estudos teóricos revelaram uma participação importante da interação eletrostática no mecanismo de ação dos inibidores. Em ordem, nosso estudo apresentado aqui consiste das seguintes partes:

- Avaliação de análogos borilados do ácido butírico como inibidores de histona deacetilase contra o *T. cruzi*. Ácidos carboxílicos de cadeia curta (especialmente o ácido butírico) são conhecidos inibidores da enzima histona deacetilase. Tendo em vista os ácidos borônicos serem espécies químicas com especial atividade biológica devido às propriedades singulares desta espécie química (tais como sua distribuição de carga). Investigou-se a possibilidade destes análogos borilados do ácido butírico terem uma atividade inibitória maior do que a dos ácidos carboxílicos correspondentes. Os resultados revelaram que o metabolismo afeta bastante a atividade destes compostos aparentemente devido à sensibilidade desta espécie química às reações como a desboronação-oxidativa cujos principais compostos responsáveis (espécies reativas do oxigênio) estão presentes em larga escala em organismos como o *T. cruzi*.

- Os testes com concentrações conhecidas (na forma de micro-emulsões) de inibidores da histona deacetilase e inibidores da ciclooxigenase também foram avaliadas. Os inibidores da enzima histona deacetilase podem (como já é bem conhecido experimentalmente) potencializar através de sinergismo a atividade de outros inibidores.

Assim, testamos a viabilidade de potencializar a atividade dos inibidores não esteroidais de ciclooxigenase! Entretanto, novamente, o metabolismo parece reduzir de forma importante para a atividade sinérgica destes compostos.

- Foram conduzidas simulações para avaliar o mecanismo de ação dos ácidos carboxílicos de cadeia curta inibidores da histona deacetilase. Estes inibidores parecem se comportar de forma ligeiramente diferente de outras espécies químicas capazes de inibir a histona deacetilase (tais como os ácidos hidroxâmicos). Realizamos algumas simulações em dinâmica estocástica e algumas em **ab initio** DFT especialmente devido à presença de elementos químicos de caráter metálico (zinco e sódio) nas estruturas estudadas. Há evidências de um sítio alostérico nesta enzima e encontramos que este sítio deve contribuir de forma importante tanto na estabilização da molécula quanto no mecanismo de ação do ácido butírico em especial. A provável cavidade alostérica ficou evidenciada pela proximidade do sítio ativo; pela presença de metais alcalinos (sódio e potássio) e pela estrutura similar à estrutura do sítio ativo.

Nesta cavidade há presença de um elemento químico metálico (um metal alcalino) complexado a um aminoácido contendo cadeias laterais carregadas especialmente o aspartato cuja cadeia lateral consiste na estrutura de um butirato. O ganho de estabilidade no mecanismo, com a interação simultânea nos sítios ativo e alostérico pelos ácidos carboxílicos de cadeia curta, é relevante e pode revelar uma participação deste sítio no próprio mecanismo de atividade da enzima.

- Os estudos mecanísticos também revelam uma predominância da interação eletrostática entre inibidor e enzima e a participação de uma interação entre anéis aromáticos (interação de *stacking* – ‘empilhamento’). Assim, simulamos espécies químicas carregadas (na forma zwitteriônica) as quais possuem algumas atividades biológicas conhecidas. Visto que as espécies químicas conhecidas como betaínas (a glicinil-betaína) apresentam-se na forma zwitteriônica naturalmente e que espécies zwitteriônicas favorecem a interação eletrostática com o sítio ativo da histona deacetilase, avaliamos *in silico* a atividade deste composto também. As interações desta molécula e de alguns análogos mostram-se bastante favorecidas em relação ao ácido butírico. O caráter hidrofílico da enzima histona deacetilase é bastante acentuado pela presença de espécies químicas carregadas. A atividade epigenética da glicinil betaína já conhecida e atribuída à participação

na metilação e demetilação do ADN, pode ter uma contribuição desta atividade inibitória sobre a histona deacetilase.

- Foram avaliados vários inibidores quanto à possível atividade tripanocida. Avaliamos, em particular, se inibidores da transcriptase reversa do HIV-1 capazes de inibir ADN polimerases específicas do HIV-1 poderiam ser capazes de inibir algumas ADN polimerases do *T. cruzi*. Os resultados revelaram diferenças entre a atividade deste composto em diferentes formas do *T. cruzi*. Conquanto a forma epimastigota seja resistente a muitos compostos, a forma amastigota intracelular é especialmente sensível a certos inibidores. Este é um resultado importante visto que a forma amastigota intracelular é responsável boa parte dos efeitos danosos observados na patologia de Chagas sobre o músculo cardíaco. Há evidências de que esta forma morfológica do parasito também participa na manutenção da infecção durante a fase indeterminada da doença.

1.1 Revisão bibliográfica

A descoberta de novos fármacos e terapias aumentou significativamente a expectativa e qualidade de vida nas últimas décadas. A pesquisa por novos fármacos, entretanto, tornou-se muito onerosa. Segundo alguns autores, o custo médio de desenvolvimento de um novo fármaco em 1987 era de 231 milhões de dólares¹. No ano 2000, este custo já era estimado em 802 milhões de dólares. Embora não haja um consenso sobre a causa desse aumento, assume-se que contribuem para esta elevação as exigências legais para o licenciamento de um novo fármaco, o aumento no interesse em pesquisa de terapias para doenças crônicas e degenerativas, as quais exigem uma maior e mais rigorosa etapa clínica na sua avaliação, e mesmo na necessidade de um maior número de testes relacionando custo-eficiência dos fármacos em relação aos já disponíveis no mercado.¹

Uma das maneiras utilizadas para a descoberta de novos fármacos envolve a modificação de uma molécula com atividade conhecida pela introdução de novos grupos químicos. Esses grupos, chamados de bioisósteros, são capazes de melhorar propriedades físico-químicas do medicamento avaliado, tais como solubilidade, lipofilicidade, etc. Entre os bioisósteros clássicos encontramos grupos monovalentes como amina (-NH₂); hidroxila (-OH); metila (-CH₃), etc. Há também grupos divalentes como “metileno” (-CH₂-), átomos de

oxigênio e enxofre; e grupos trivalentes como grupos contendo átomos de fósforo (-P=). Entre os bioisómeros não-clássicos pode-se citar o átomo de boro. Este elemento apresenta uma série de propriedades químicas de interesse farmacológico, incluindo sua capacidade de agir como ácido de Lewis, capacidade de formar ligações covalentes com hidroxilas de aminoácidos, além da possibilidade de formar ligações de hidrogênio não-convencionais.²

Em outra abordagem para a criação de medicamentos novos, adota-se o conceito de molécula híbrida, isto é, reunir em uma mesma molécula dois princípios ativos diferentes capazes de agir em diferentes enzimas e/ou em sítios ativos diferentes da mesma enzima. Esta combinação de princípios ativos faz com que cada princípio potencialize a atividade do outro em um fenômeno conhecido como sinergismo.³

Neste trabalho, investigamos a atividade de análogos borilados do principal ácido carboxílico de cadeia curta inibidor da enzima histona deacetilase, o ácido butírico, e de uma molécula híbrida composta pelo ácido butírico e pelo inibidor de prostaglandina sintetase ácido salicílico (“aspirina”). Em ambos os casos, estudamos a atividade destes compostos contra o protozoário *Trypanosoma cruzi* parasita causador da doença de Chagas.

Nas seções seguintes, serão apresentadas descrições da epidemia da doença de Chagas e da patologia, bem como as características da quimioterapia utilizada no tratamento em uso atualmente. A seguir, serão apresentados o potencial uso dos inibidores de histona deacetilase no combate ao parasito e a investigação de novos medicamentos produzidos pela utilização de bioisómeros de boro e de moléculas híbridas.

1.2 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar teórica e experimentalmente novos compostos para combater a infecção da doença de Chagas. Os compostos avaliados serão tanto compostos novos baseados em ácidos borônicos bem como algumas moléculas pequenas análogos de ácidos graxos de cadeia curta, cuja investigação auxiliará na compreensão do mecanismo e na proposição de novos medicamentos. O potencial de aplicação de ácidos borônicos (análogos de ácidos carboxílicos de cadeia curta) é significativo e pode ser amplamente explorado para a inovação na área de medicação antiparasítica, especialmente como medicamentos tripanocida. Pretende-se também avaliar

os mecanismos de atividade exercidos por alguns destes compostos. A enzima histona deacetilase é o principal alvo investigado para este propósito. Tendo em vista que a descrição dos mecanismos de atividade permite a proposição de novas moléculas com as propriedades específicas para otimizar a inibição enzimática, são propostos alguns compostos baseados nos resultados das simulações. Também será feita uma breve investigação sobre a atividade antirretroviral de análogos da nevirapina como parte dos estudos sobre esta molécula. Ácidos borônicos são potentes inibidores enzimáticos pouco investigados quanto a sua atividade inibitória de enzimas histona deacetilase de *T. cruzi*.

1.3 Objetivos Específicos

- Investigar teórica e experimentalmente a atividade de ésteres borônicos de cadeia curta como o éster catecol do ácido n-propil-borônico e o éster pinacol do ácido n-butil-borônico sobre células infectadas com *Trypanosoma cruzi* e avaliar comparativamente em relação ao ácido butírico o potencial de utilização destes compostos no combate a doença de Chagas.

- investigar o mecanismo de inibição de ácidos graxos de cadeia curta sobre a enzima histona deacetilase

- Investigar a atividade de moléculas híbridas compostas de um inibidor de prostaglandina sintetase e de um inibidor de histona deacetilase, no combate à doença de Chagas, tais como o ácido butil-salicílico.

- Investigar a atividade de ácidos hidroxâmicos de cadeia curta.

- Investigar o potencial uso do inibidor de transcriptase reversa nevirapina para o combate a infecção por *T. cruzi*.

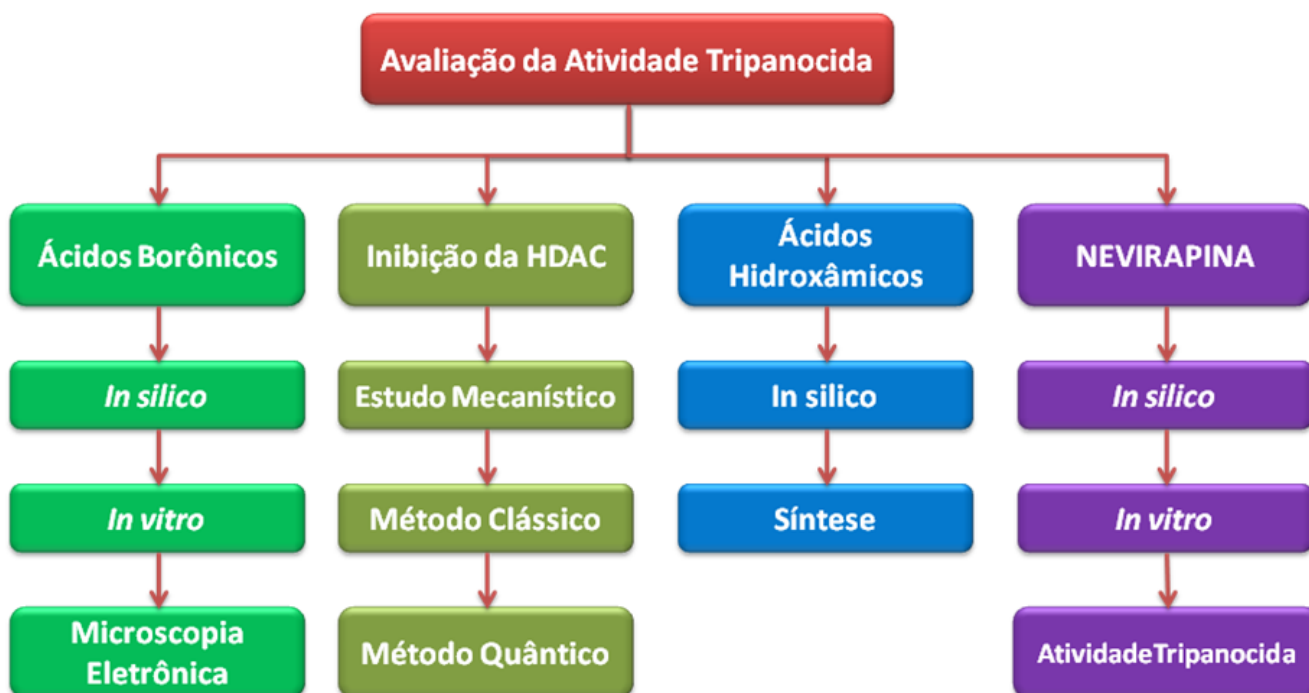


Figura 1 Fluxograma do trabalho de pesquisa apresentado

Capítulo 2

A Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitida ao homem por insetos hematófagos, como alguns barbeiros muito comuns na América do Sul com ampla disseminação no Brasil. Este protozoário, descoberto pelo brasileiro Carlos Chagas em 1909, foi denominado *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Osvaldo Cruz. A patologia é endêmica na maior parte das áreas rurais da América Central e do Sul. Muitos países nestas regiões, tais como Argentina, Brasil e Venezuela, desenvolveram políticas públicas de combate ao principal vetor (o barbeiro) alcançando diferentes níveis de sucesso, mas a abertura de novas fronteiras agrícolas na Amazônia, o fluxo migratório e transfusão de sangue têm criado novas situações de risco de epidemias.⁴ Estima-se que aproximadamente 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas com *Trypanosoma cruzi* ao redor do mundo, com um número de casos fatais se aproximando de 23.000 anualmente. A transmissão materno-infantil também é importante. Estima-se que cerca de 40.000 mulheres gestante e 2.000 recém-nascidos estejam infectados com *T. cruzi* na América do Norte (Canadá, Estados Unidos e México).⁵

. O continente Europeu também apresenta um número significativo de portadores do *T. cruzi* devido à imigração. Estima-se que haja na Europa entre 24.000 a 37.000 portadores de *T. cruzi*, embora seja difícil estimar este número devido à imigração ilegal que torna o levantamento de dados epidemiológicos imprecisos.⁶

A enfermidade se transmite por meio dos insetos portadores, da família dos reduvídeos, cujas espécies mais comuns são *Triatomas infestans*, *Panstrongylus megistus* e *Rhodnius prolixus*. Os vetores adquirem o *T. cruzi* ao se alimentarem do sangue de um mamífero infectado. Os protozoários, depois de penetrarem nos intestinos dos insetos, passam por diversos estágios e se reproduzem com rapidez. Novamente metamorfoseando-se em formas infectantes, dirigem-se ao intestino reto do barbeiro e são eliminados juntamente com as fezes. Há evidências de transmissão também por ingestão de bebidas contaminadas por fezes do barbeiro.⁷

Durante o dia, os insetos transmissores ocultam-se nas fendas das paredes dos casebres rurais de barro ou de adobe. À noite picam as pessoas adormecidas, em geral nas partes descobertas do corpo, como as pálpebras, onde a pele é mais fina. Como o inseto portador em geral defeca enquanto chupa o sangue de sua vítima, a pequena laceração feita pela picada é facilmente contaminada.

A picada do triatomíneo lesa o epitélio e permite a penetração da forma tripomastigota metacíclica. O *T.* pode parasitar inicialmente o epitélio e cumprir o seu ciclo intracelular ou atravessar a epiderme lesada e parasitar aleatoriamente células da derme, como macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. No interior das células, o tripomastigota transforma-se em amastigota o qual se reproduz binariamente a cada 12 horas, podendo originar até 540 parasitas/célula. Neste momento, dois eventos podem ocorrer: a célula hospedeira e o parasita degeneram e morrem ou o ciclo do parasita se completa, a célula rompe e as três formas, tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas, são liberadas nos interstícios.⁷

2.1 O Parasito

O *T. cruzi* é um flagelado da família *Trypanosomatidae* que parasita mamíferos. O *T. cruzi* apresenta muitas variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de variações quanto à sua infectividade e patogenicidade, o que leva autores a pensar que não se trate de uma espécie bem definida, mas sim de um “complexo *cruzi*” englobando várias entidades de difícil definição taxonômica.

Em seu ciclo vital, o parasito exhibe as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota ou de transição entre elas. O *T. cruzi* pertence à classe *Kinetoplastea*, a qual possui vários protozoários flagelados que causam enfermidades humanas. A principal característica que distingue este grupo é uma estrutura sub-celular conhecida como cinetoplastos. O cinetoplasto é uma estrutura em forma de grânulo que contém ADN. O tamanho do cinetoplasto pode variar de acordo com a espécie. O cinetoplasto é encontrado próximo ao corpo basal que está localizado na base do flagelo. Devido a sua localização próxima ao flagelo, acreditava-se que esta estrutura estivesse envolvida no movimento

celular. Na verdade, o cinetoplasto está associado à mitocôndria, que neste grupo de organismos é única (Figura.2).¹⁰

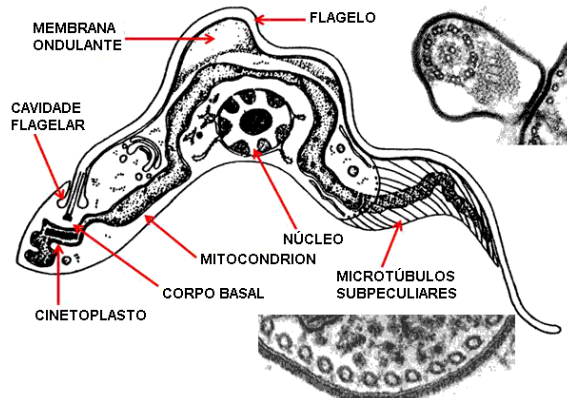


Figura 2 Estrutura da célula do *Trypanosoma cruzi*.

As quatro formas principais de cinetoplastos que causam doenças humanas diferenciam-se principalmente pela posição do cinetoplasto.¹⁰ Na forma *Tripomastigota*, o cinetoplasto está localizado na extremidade posterior do parasito. O flagelo emerge da extremidade posterior e se enovela ao longo do corpo do parasito. Esta ligação do flagelo com o corpo forma uma membrana ondulante que se espalha por toda a extensão do parasito e o flagelo livre emerge da extremidade anterior. Esta extremidade é considerada anterior uma vez que o flagelo impulsiona o organismo. A membrana ondulante auxilia na motilidade do organismo (Figura 3).

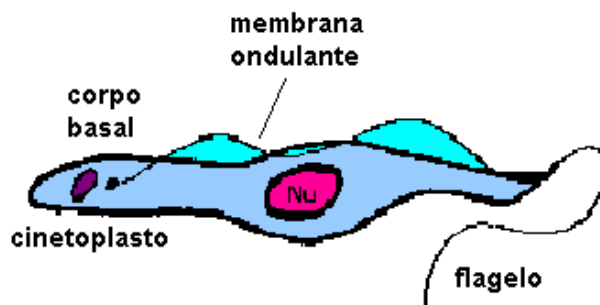


Figura 3 Estrutura do *T. cruzi* tripomastigota

Na forma *Epimastigota* o cinetoplasto é localizado mais ao centro, normalmente logo anterior ao núcleo (Nu). O flagelo emerge no meio do parasito e forma uma membrana

ondulante mais curta do que no tripomastigota. O epimastigota possui uma motilidade notavelmente menor do que o tripomastigota (Figura.4).

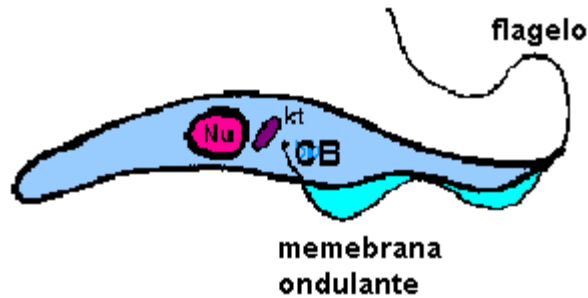


Figura 4 Estrutura do *T. cruzi* epimastigota

Na forma *promastigota*, o cinetoplasto localiza-se em direção à extremidade anterior e um flagelo livre sem membrana ondulante emerge nesta extremidade (Figura 5).

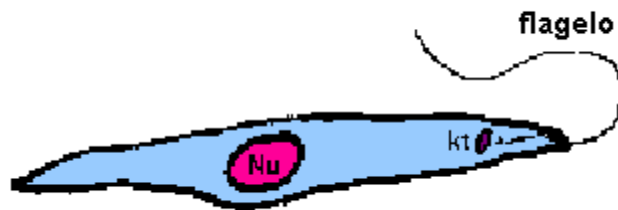


Figura 5 Estrutura do *T. cruzi* promastigota

Na forma amastigota o parasito possui uma forma mais esférica e não tem flagelo livre. O corpo basal e a base do flagelo ainda estão presentes. O cinetoplasto é normalmente detectável como um corpo granulado escuro próximo ao núcleo. Esta forma é um estágio intracelular sem movimento (Figura 6).¹⁰

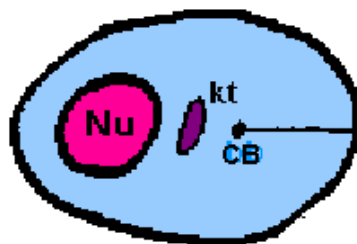


Figura 6 Estrutura do *T. cruzi* amastigota

Nos hospedeiros ocorrem os *tripomastigotas de tipo sanguícola* e os *amastigotas intracelulares*, enquanto nos hospedeiros invertebrados e em meios de cultura predominam as formas epimastigotas, que passam depois a tripomastigotas metacíclicos. 9

2.2 Tripomastigotas Sanguícolas

No sangue periférico dos mamíferos, o *T. cruzi* apresenta-se como um pequeno flagelado, medindo 10 a 25 µm de comprimento por 1 a 5 µm de largura. Observa-se um nítido polimorfismo nos tripanossomos sanguíneos onde se descreve normalmente dois tipos morfológicos polares: as *formas finas* com 20 µm de comprimento por 1 µm de largura, sinuosas, com o cinetoplasto afastado da extremidade posterior que é longa e delgada, destacando a saliência do cinetoplasto; o núcleo é longo e estreito, contendo grânulos frouxamente reunidos. A membrana ondulante dessa forma é rápida e direcional, de modo que o parasito atravessa facilmente o campo microscópico; e as *formas largas*, caracteristicamente curvadas em C ou U ou com uma dupla curvatura em S; medem até 15 µm, com o cinetoplasto muito próximo da extremidade posterior; núcleo elipsóide ou redondo, de aspecto compacto; membrana ondulante bem visível e flagelo longo. A movimentação é lenta e não direcional, agitando-se o parasito no campo microscópico quase sem se afastar-se do lugar. 9

Algumas formas delgadas do tripomastigotas desaparecem rapidamente da circulação seja por terem penetrado em células ou tecidos do hospedeiro, onde se transformam em amastigotas, ou por serem sensíveis às reações imunológicas. As formas largas, por outro lado, persistem por muito tempo na corrente sanguínea do hospedeiro e não penetram nas células além de se mostrarem bastante resistentes às reações imunológicas. Estas formas tendem a se acumular no sangue e caracterizam a parasitemia de períodos crônicos da infecção.

2.3 Amastigotas Intracelulares

A transformação de tripomastigota em amastigota em tecidos cultivados *in vitro* depende de certos fatores tais como temperatura, nutrientes disponíveis no meio e pH. Em

geral, esta transformação leva cerca de 12 horas, mas em condições favoráveis (37°C, pH = 5 e sem a presença de Soro Fetal Bovino no meio), pode ocorrer em apenas 3 horas. Esta transformação envolve uma série de mudanças na morfologia que vão da redução do comprimento à mudança na expressão das moléculas da superfície do parasito (a forma amastigota expressa a Glicoproteína de superfície amastigota-específica (Ssp-4)). Os tripomastigotas também apresentam maior distância entre o núcleo e o cinetoplasto do que o amastigota sendo que a forma do cinetoplasto também é bastante diferente em ambas as formas do *T. cruzi*. Tanto a forma amastigota quanto a forma tripomastigota são resistentes ao efeito lítico promovido pelo sistema complemento, ao contrário da forma epimastigota a qual é susceptível a este efeito do sistema imune. ^{11,12}

O mecanismo de interiorização do parasito corresponde a um processo de fagocitose induzida, da qual participam tanto o parasito quanto a célula hospedeira, sendo precedida pela aderência dos tripomastigotas à membrana do macrófago ou de outras células. Vários fatores participam desta interiorização. Quando tratados com a enzima alfa-manosidase, as formas tripomastigota e tripomastigota metacíclica aumentam significativamente sua capacidade de se associar aos macrófagos e mioblastos. Por outro lado, macrófagos e mioblastos, quando tratados com a mesma enzima, se tornam mais resistentes à infecção pelo *T. Cruzi* o que sugere que resíduos de manose na superfície do parasito e das células hospedeiras contribuem para o processo de infecção.¹³ A redução de colesterol de membranas de células HeLa também reduz a infecção por Tripomastigotas metacíclicos e amastigotas extracelulares.¹⁴

O parasito fica contido em um vacúolo digestivo (fagossomo) onde pode ser ocasionalmente morto e digerido. Este desfecho tem lugar sempre que formas epimastigotas são fagocitadas por macrófagos, pode ser evitado pelos tripomastigotas que escapam do vacúolo digestivo e invadem o citoplasma da célula parasitada.

Uma vez no interior celular, os tripomastigotas transformam-se em amastigotas ovóides, que medem 4 µm de diâmetro máximo. Com o desaparecimento do flagelo livre e da membrana ondulante, o aparelho locomotor do parasito fica reduzido ao segmento contido no bolso flagelar. O único movimento que os amastigotas apresentam é o de rotação. O cinetoplasto aparece como um bastonete curto e encurvado situado perto do núcleo ovóide e compacto. 9

Fisiologicamente, a característica mais importante dos amastigotas é a recuperação da capacidade de multiplicação que se manifesta cerca de 35 horas após a invasão da célula hospedeira. Mediante uma divisão binária simples, que se repete em intervalos de 12 horas, cada amastigota produz um número crescente de elementos filhos que vão consumindo o citoplasma da célula parasitada até que, cerca de 12 horas antes de provocarem a ruptura celular, sofrem uma nova transformação de amastigotas para tripomastigotas. O ciclo intracelular dura cerca de 5 ou 6 dias e produz cerca de nove gerações de parasitos. Há evidências de que a forma amastigota do *T. cruzi* também possa infectar células. Testes já demonstraram que amastigotas extracelulares cultivados *in vitro* podem infectar monócitos humanos e se replicam em um intervalo de tempo (10 horas) idêntico ao dos amastigotas intracelulares apresentando a mesma morfologia de seus equivalentes intracelulares. Devidos as diferenças entre os antígenos de superfície da membrana celular dos amastigotas e dos tripomastigotas, é provável que o mecanismo de infecção da célula hospedeira sejam diferentes também. ¹⁵ Há evidências de que amastigotas extracelulares dependam da polimerização de filamentos de actina do hospedeiro para promover a infecção celular. ¹⁶

O mecanismo regulador da transformação entre as formas do *T. cruzi* ainda é desconhecido, havendo algumas evidências de que estas transformações são sensíveis à temperatura. ⁹ É interessante notar que as diferentes formas do *T. cruzi* apresentam diferentes níveis de acetilação da proteína histona o que sugere um possível mecanismo epigenético na regulação do ciclo biológico deste parasito. ¹⁷

2.4 O Ciclo Evolutivo

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* compreende vários estágios sendo alguns não-reprodutivos, quando os micro-organismos são encontrados no sangue, e estágios reprodutivos, em que eles se encontram nas células de diversos tecidos. As formas apresentadas pelos *T. cruzi* durante seu ciclo evolutivo são chamadas de amastigota, promastigota, epimastigota, esferomastigota e tripomastigota. ¹⁸ O *T. cruzi* pode infectar quaisquer células, mas afeta preferencialmente as do tecido conjuntivo e as fibras musculares, particularmente as do coração. ¹⁹ (Figura 7)

Doença de Chagas: ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

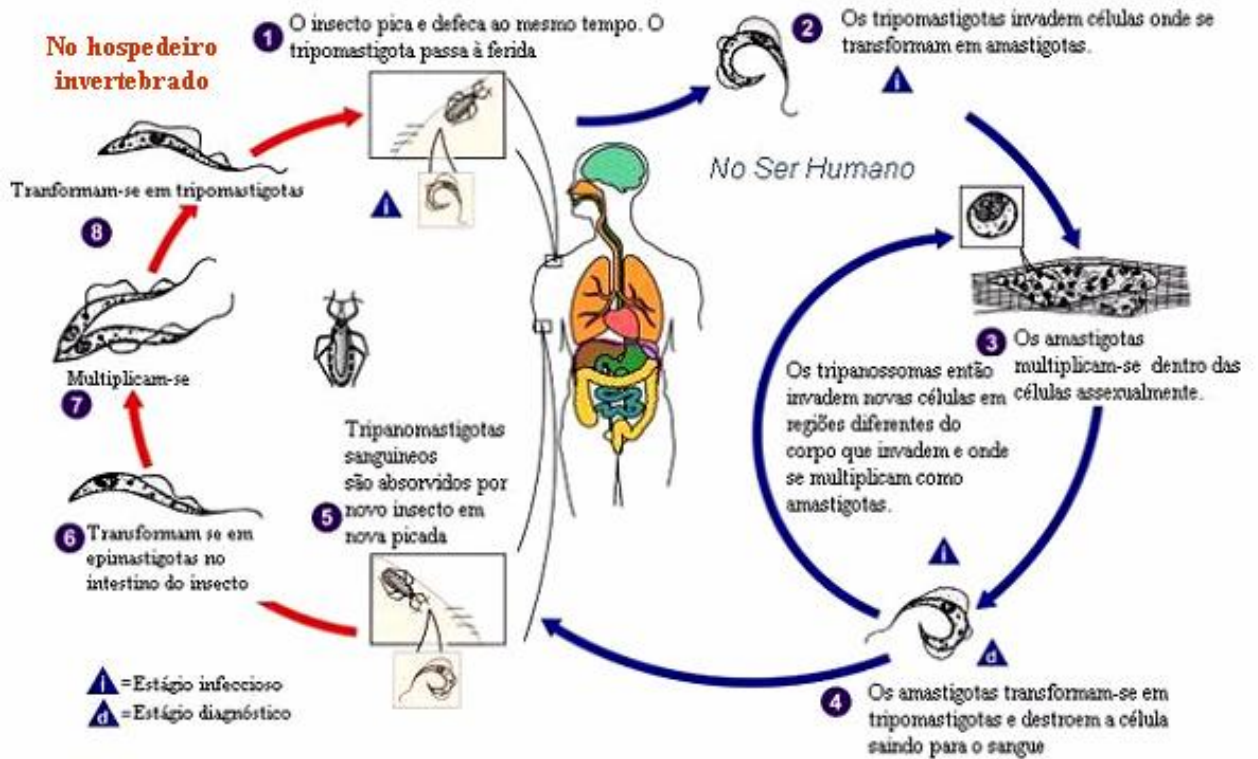


Figura 7 Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*

Os estudos mostram que a invasão e replicação *T. cruzi* em cardiomiócitos causa danos celulares, um estresse oxidativo e alterações morfológicas nas mitocôndrias destas células (observa-se um aumento no volume das mitocôndrias bem como a diminuição em seu número no interior de cardiomiócitos infectados).²¹

Há três lesões básicas induzidas pelo *T. cruzi* nos tecidos dos vertebrados: resposta inflamatória; lesões celulares; alteração da matriz extracelular.

2.5 A Resposta Inflamatória

A resposta básica do hospedeiro ao *T. cruzi* é de natureza inflamatória. Ao penetrarem no organismo, os tripomastigotas vão para o interior das células (principalmente macrófagos) e iniciam a multiplicação após assumir a forma amastigota. Em órgãos ricos em macrófagos, tais como o fígado e o baço, a presença de parasitas pode estimular a forte acumulação difusa e focal destas células, com necrose, metamorfose gordurosa nos hepatócitos e produção de ascite.²²

A resposta inflamatória ocorre quando a célula parasitada rompe e libera no interstício as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do parasita (estejam elas íntegras ou degeneradas) e os restos da célula hospedeira. Por esta razão, inicialmente a inflamação é focal e associada topograficamente com o parasitismo (forma-se tantos focos quanto maior for o número de células parasitadas que se rompe).⁷ A forma tripomastigota do *T. cruzi* é capaz de produzir vesículas enriquecidas em glicoproteínas. Camundongos inoculados com estas vesículas desenvolvem uma severa patologia cardíaca e uma intensa resposta inflamatória.²³

Embora o parasitismo contribua de maneira importante para a resposta inflamatória, acredita-se que devam existir outros fatores que participam desta resposta uma vez que, com a evolução da infecção o número de parasitas se reduz acentuadamente, o que reforça a hipótese de que mais fatores induzem a resposta inflamatória, (talvez auto-imunidade).⁸

2.6 Lesões Celulares

As lesões em células parasitadas ocorrem por vários mecanismos. A citólise causada pelo *T. cruzi* ocorre por ação direta do parasita através da ação de enzimas como hidrolases ácidas, da inibição da fosforilação oxidativa, etc. Em células não-parasitadas, aparentemente, a resposta imunológica, tanto inflamatória quanto citotóxica, contribui para os danos observados.⁷

2.7 Alterações na Matriz Extracelular

A alteração mais importante é a fibrose, que se caracteriza pela deposição progressiva de fibrolectina, laminina e colágeno no interstício, com consequente expansão e distensão da matriz extracelular. A fibrose é considerada a principal causa da perda de atividade contrátil do miocárdio.

Além da fibrose, outras alterações na matriz extracelular são observadas. Há uma variedade de enzimas que o *T. cruzi* produz as quais são capazes de degradar proteínas na matriz extracelular bem como a secreção anormal de matriz extracelular, observadas em células endoteliais infectadas com este protozoário.⁷

2.8 A Doença de Chagas Adquirida

A fase aguda da Doença de Chagas consiste na infecção generalizada do hospedeiro pelo *T. Cruzi*. As células parasitadas incluem macrófagos, células gliais, células adiposas, células endoteliais, fibras musculares lisa, esquelética e cardíaca, fibroblastos, células de Schwann e neurônios. Entre a fase aguda e a fase crônica há um longo período (cerca de 10 anos) no qual não se observa nenhuma manifestação da patologia (chamada às vezes de forma latente). Após este período, inicia-se a fase crônica, considerada, pela sua gravidade e frequência, a mais grave, caracterizando-se por insuficiência cardíaca, transtornos do ritmo e condução, fenômenos tromboembólicos e morte súbita.⁸ Os órgãos predominantemente afetados são o coração e o tubo digestivo (esôfago e intestino grosso); como na fase aguda, há acometimento do sistema nervoso central, da musculatura esquelética, das supra-renais e de outras vísceras.⁷

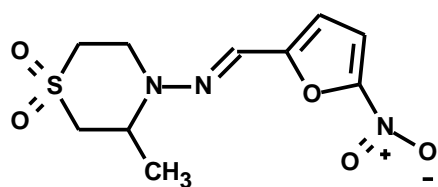
A fase inicial da infecção pelo *T. cruzi* é, geralmente, imperceptível. Os casos sintomáticos da infecção aguda são raros. A fase aguda é normalmente assintomática (cerca de 95% dos casos). A mortalidade na fase aguda quando sintomática é estimada em 1:2500 e 1:5000. Estima-se que dois terços dos 18 milhões de portadores do *T. cruzi* não têm manifestação clínica da doença detectável. A doença acomete o coração em 94,5% dos casos classificados como portadores da forma crônica cardíaca da doença. A insuficiência cardíaca causa o óbito em 58% dos casos e as arritmias associam-se com morte repentina

em 37,5% destes casos.²⁴ Existe uma discussão sobre a possibilidade de que uma resposta auto-imune seja em parte responsável pelos efeitos observados na patologia, especialmente no que se refere a danos ao coração, mas atualmente ainda se aceita que o *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas.²⁵

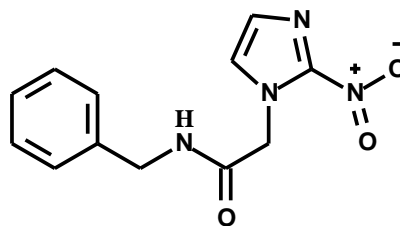
A infecção pode provocar a morte do paciente se o curso da doença não for detido a tempo. O diagnóstico é feito com a descoberta do parasita no sangue. As reações sorológicas são úteis na fase aguda da doença. O diagnóstico na fase crônica baseia-se na anamnese, nos exames físicos, radiológicos, eletrocardiográfico e, principalmente, na reação de Machado Guerreiro -- análise laboratorial do sangue para excluir doadores contaminados.

2.9 A Quimioterapia da Doença de Chagas

O tratamento da doença de Chagas é considerado atualmente insatisfatório. Não há erradicação do agente etiológico do organismo (“cura”) e os medicamentos comercialmente disponíveis são destinados apenas para a fase aguda.²⁴ Os dois medicamentos mais utilizados, o nifurtimox [4-(5-nitrofurilidenoamino-) tetrahydro-4-4-1, 4-tiazina-1-1-dióxido] e o benzonidazol [N-(benzil-2-nitro-imidazolacetamida)] (Figura 8) já tiveram efeitos colaterais descritos, tais como: mutagenicidade, teratogenicidade, carcinogenicidade e efeitos esterilizantes significativos.²⁴ Além disso, mais de 80% dos pacientes tratados com estes medicamentos não desenvolvem cura parasitológica (definida como resultados negativos para todos os testes parasitológicos e sorológicos).²⁵ A profilaxia da doença baseia-se no combate ao transmissor, com inseticidas de alta toxicidade e efeito prolongado, na substituição ou melhoria das habitações de higiene precária e principalmente na conscientização da população das áreas endêmicas. A Organização Mundial de Saúde recomenda um tratamento que dura de 30 a 60 dias para a quimioterapia (Tabela 1 Tratamento recomendado para a doença de Chagas).



Nifurtimox



Benzonidazol

Figura 8 Estruturas moleculares do Nifurtimox e do Benzonidazol

Tabela 1 Tratamento recomendado para a doença de Chagas

Tratamento			
Droga	Condição	Dose (mg/kg/d)	Duração (dias)
Nifurtimox	Fase aguda	10-12	30-60
	Fase crônica	8-10	60-90
Benzonidazol	Crianças, fase aguda	7,5	60
	Adultos, fase aguda	5	30-60
	Fase crônica	5	30

A ausência de uma formulação pediátrica para a medicação atualmente disponível é um dos problemas na quimioterapia da Doença de Chagas. O desenvolvimento de novos medicamentos contra a doença de Chagas é muito importante, tendo em vista o desenvolvimento de resistência pelo parasito. Um grave problema associado ao desenvolvimento de novos medicamentos é a necessidade de um medicamento para atuar durante a fase crônica da doença. Como esta fase é assintomática, a identificação de um grupo de pacientes infectados para a realização da triagem clínica é bastante difícil e reduz o interesse da indústria farmacêutica nesta pesquisa.²⁶ A capacidade do *T. cruzi* de infectar e promover um parasitismo de células de mamíferos, diferente dos protozoários *Leishmania* (causador da leishmaniose - “calazar”) e do *Trypanosoma brucei* (causador da tripanosomíase africana - “Doença do sono”), os quais ficam livres na corrente sanguínea, dificulta o tratamento da Doença de Chagas, visto que, para tratar a fase crônica as drogas precisam atingir o *T. cruzi* dentro da célula hospedeira sem ser danoso para a mesma.²⁷

Capítulo 3

Epigenética

O termo epigenética foi cunhado por Waddington em 1942 referindo-se à forma como o genótipo relaciona-se com o fenótipo. Atualmente considera-se epigenética as alterações fenotípicas que não possuem alterações genotípicas correspondentes. A epigenética “*marca se, como e onde a informação genética será lida*”. Assim como a informação genética, a informação epigenética também é transmitida hereditariamente, isto é, os padrões diferenciados de expressão genética são transmitidos de geração para geração, embora esta informação seja menos estável do que a informação genética. Duas modificações são importantes na determinação do padrão diferencial de expressão dos genes: a metilação do ADN e a acetilação da histona. Conquanto a preservação do padrão de metilação do ADN pareça ser oriunda do mesmo mecanismo semi-conservativo de replicação do ADN, a herança do padrão de acetilação da histona parece ser um tanto mais sofisticada, baseando-se talvez no próprio padrão de metilação do ADN.²⁸

Assim como as células de metazoários, as células do *T. cruzi* apresentam um padrão próprio de “código epigenético”. Estudos recentes têm revelado que fatores epigenéticos contribuem para virulência de protozoários parasitas. Uma das maneiras de escape da resposta imunológica desenvolvida por protozoários é a mudança periódica na expressão de moléculas de superfície (proteínas do parasito ou derivadas do parasito sobre a célula hospedeira). Esta forma de escape do sistema imunológica é conhecida como variação antigênica. Ao longo do ciclo biológico do *T. cruzi* em suas diferentes formas, a expressão diferencial é observada, evidenciando a participação da epigenética na regulação da virulência deste micro-organismo.²⁹

3.1 A Apoptose Celular

A apoptose ou morte celular programada pode ser definida como “*um processo ativo dependente de energia iniciado por uma variedade de estímulos, intra ou extracelulares, no qual a célula viva induz sua própria morte*”³⁰. A apoptose é regulada por um conjunto de

enzimas chamadas de caspases. Há dois mecanismos básicos pelo qual a apoptose ocorre na célula: a apoptose intrínseca (ou mitocondrial) a qual ocorre em decorrência da permeabilização da membrana mitocondrial externa e a consequente liberação de fatores pró-apoptose com a ativação da caspase-9³¹. e a apoptose extrínseca relacionada ao “receptor de membrana para a apoptose” (do inglês, *death receptor pathway*) o qual ativa as enzimas caspase-8 e caspase-9.

É importante entender que a “morte celular” pode ocorrer por via apoptótica ou por necrose. Algumas evidências sugerem que há um mecanismo de morte celular programada também por necrose mediada pelo pH do meio extra-celular.³²

Observou-se recentemente que micro-organismos unicelulares, como protozoários, também exibem características típicas de apoptose. Embora pareça contraditório que organismos unicelulares possuam mecanismos de apoptose, evidências experimentais têm revelado que, de fato, células de micro-organismos unicelulares, principalmente, protozoários parasíticos, possuem mecanismos apoptóticos. Esses micro-organismos se organizam em populações e estabelecem comunicação inter-celular. Curiosamente, as enzimas caspases, principais responsáveis pelo processo apoptótico em organismos de metazoários, não têm sido detectadas em protozoários o que implica que estas enzimas não podem estar envolvidas na apoptose de protozoários.

As características morfológicas e bioquímicas típicas de apoptose foram identificadas em protozoários parasíticos como o *T. cruzi*. Estas características incluem condensação da cromatina, fragmentação do ADN, despolarização do potencial da membrana mitocondrial, liberação de citocromo c, ativação de proteases e desestruturação da membrana celular (“*membrane blebbing*”). Estudos já revelaram que micro-organismos unicelulares são capazes de secretar sinalizadores químicos. Supõe-se que, se micro-organismos são capazes de perceber seu meio, eles seriam capazes de interagir e formar comunidades complexas de maneira análoga ao de organismos multicelulares. Embora os *T. cruzi* não possuam enzimas caspases, já se identificou neles metacaspases embora estas não sejam análogas funcionais das caspases dos metazoários. Sua principal função parece ser o tráfego de vesículas. Outras proteases baseadas em cisteínas (“caspases”) estão supostamente envolvidas na apoptose do protozoário.³³ Níveis consideráveis de apoptose

são encontradas na forma amastigota do *T. cruzi* enquanto a forma tripomastigota apresenta níveis menores da morte celular programada.³⁴

A morte celular programa (“apoptose”) de protozoários induzida por quimioterapia também já foi descrita. Estudos de microscopia eletrônica com análogos lisofosfolipídeos, por exemplo, têm demonstrado induzir a morte de células de *T. cruzi* com características típicas de morte celular programada tais como desorganização das membranas internas do sistema mitocondrion-cinetoplasto, desestruturação da membrana plasmática (*membrane blebbing*), vacuolização citoplasmática e desorganização do reservossomo.³⁵

Outra característica já observada em células de *T. cruzi* tratadas com drogas tripanocidas é a liberação de citocromo c no citosol, um evento ligado a apoptose de células de organismos multicelulares.³⁵

3.2 O ADN Eucarioto e as Proteínas Histonas.

O ADN nos cromossomos eucarióticos está fortemente ligado a um grupo de pequenas proteínas chamadas *histonas*. As histonas constituem cerca de metade da massa dos cromossomos eucarióticos, sendo a outra metade o ADN. Esse material cromossômico nucleoproteico é chamado *cromatina*. As histonas podem ser agrupadas em cinco tipos chamados: H1, H2A, H2B, H3 e H4. Elas variam em massa de aproximadamente 11 a 21 kd (ver Tabela.2). As histonas possuem um elevado conteúdo de cadeias laterais de carga positiva: cerca de 1 em cada 4 aminoácidos é ou lisina ou arginina.

Tabela 2 Tipos de Histonas

Tipo	Proporção Lis/Arg	n° de aminoácidos	Massa (kd)
H1	20,0	215	21,0
H2A	1,25	129	14,5
H2B	2,5	125	13,8
H3	0,72	135	15,3
H4	0,79	102	11,3

Cada tipo de histona pode existir em uma variedade de formas devido a modificações pós-translacionais de algumas cadeias laterais. Estas modificações podem ser acetilação, metilação, ADP-ribosilação e fosforilação. A cadeia nestas proteínas, portanto, é modulada e a sua estrutura é afetada por estas modificações.³⁶

A unidade básica da cromatina, o nucleossomo, é formado por dois tetrâmeros de histona H3-H4 e dois dímeros de H2A H2B envoltos por 146 pares de bases de ADN (Figura.9).³⁷ Esta estrutura organizacional está presente também no *T. cruzi*. Entretanto, o *T. cruzi* possui quatro núcleos alguns dos quais são os mais divergentes nas sequências primárias entre eucariotos e poderia indicar adaptação evolutiva.³⁸

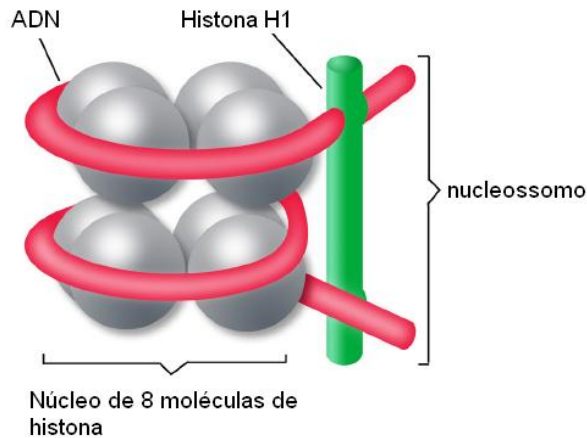


Figura 9 Estrutura do nucleossomo

A acetilação reversível da histona cumpre uma função importante na regulação da expressão genética. A acetilação e deacetilação da histona são realizadas por enzimas que modificam covalentemente esta enzima introduzindo ou removendo grupos acetil. Duas famílias de enzimas deacetilase têm sido identificadas: as histonas deacetilases e a Sir (*Silent information regulator*). As duas famílias são evolutivamente conservadas (dos procaríotos aos humanos) e ambas possuem várias funções celulares não-redundantes, muitas das quais envolvidas na regulação transcricional.³⁹

3.3 A Enzima Histona Deacetilase

A histona acetil-transferase e histona deacetilase são enzimas que fazem o controle antagônico da acetilação das cadeias laterais dos aminoácidos lisina das proteínas histona do ADN. Essas enzimas são subdividas em dois grupos de acordo com suas características filogenéticas e estruturais bem como pela especificidade de seu mecanismo catalítico.⁴⁰ A deacetilação da histona causa a suspensão da expressão de proteínas devido à condensação da cromatina. Isso se deve ao fato de que a carga positiva da lisina, quando eliminada pelo processo de acetilação da cadeia lateral da lisina, relaxa a estrutura da cromatina levando a uma acessibilidade de fatores ao ADN.³⁷

As histonas deacetilases são divididas em quatro classes. As classes I, II e IV utilizam o mecanismo catalítico dependente de zinco. As enzimas histona deacetilase da

classe III seguem um mecanismo distinto que independe da catálise por zinco. ⁴¹ A HDAC1 (Histona Deacetilase classe I) foi a primeira a ser identificada e caracterizada. A análise sequencial da HDAC1 revelou que se tratava de uma proteína humana homóloga da proteína de levedura Rpd3 (*reduced potassium dependency*) um conhecido regulador transcricional.

39

O mecanismo de acetilação promovida pela histona acetil-transferase envolve a transferência de um grupo acetil a partir da *acetil coenzima-A* para a cadeia lateral da lisina (Figura 10). ⁴¹ O mecanismo de desacetilação envolve a hidrólise da lisina acetilada com a catálise promovida pela coordenação com o zinco da carbonila acetilada (Figura 11)

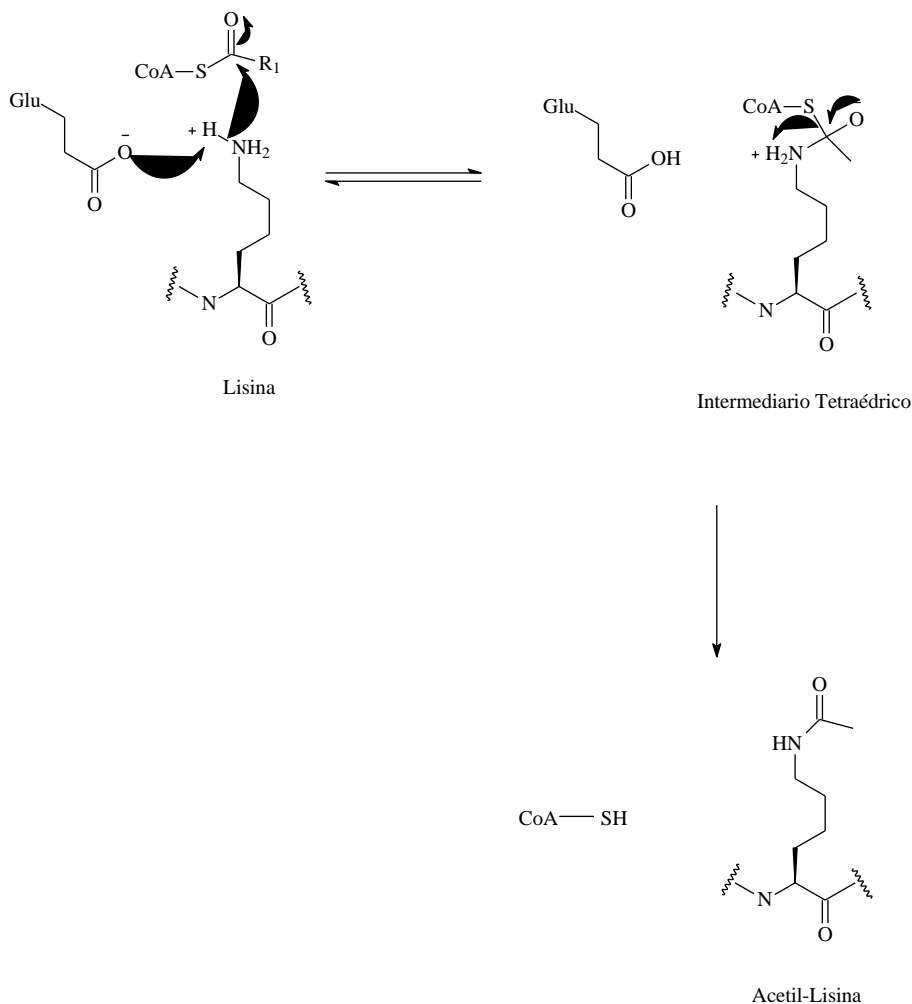


Figura 10 Mecanismo de acetilação da Histona pela histona acetil transferase

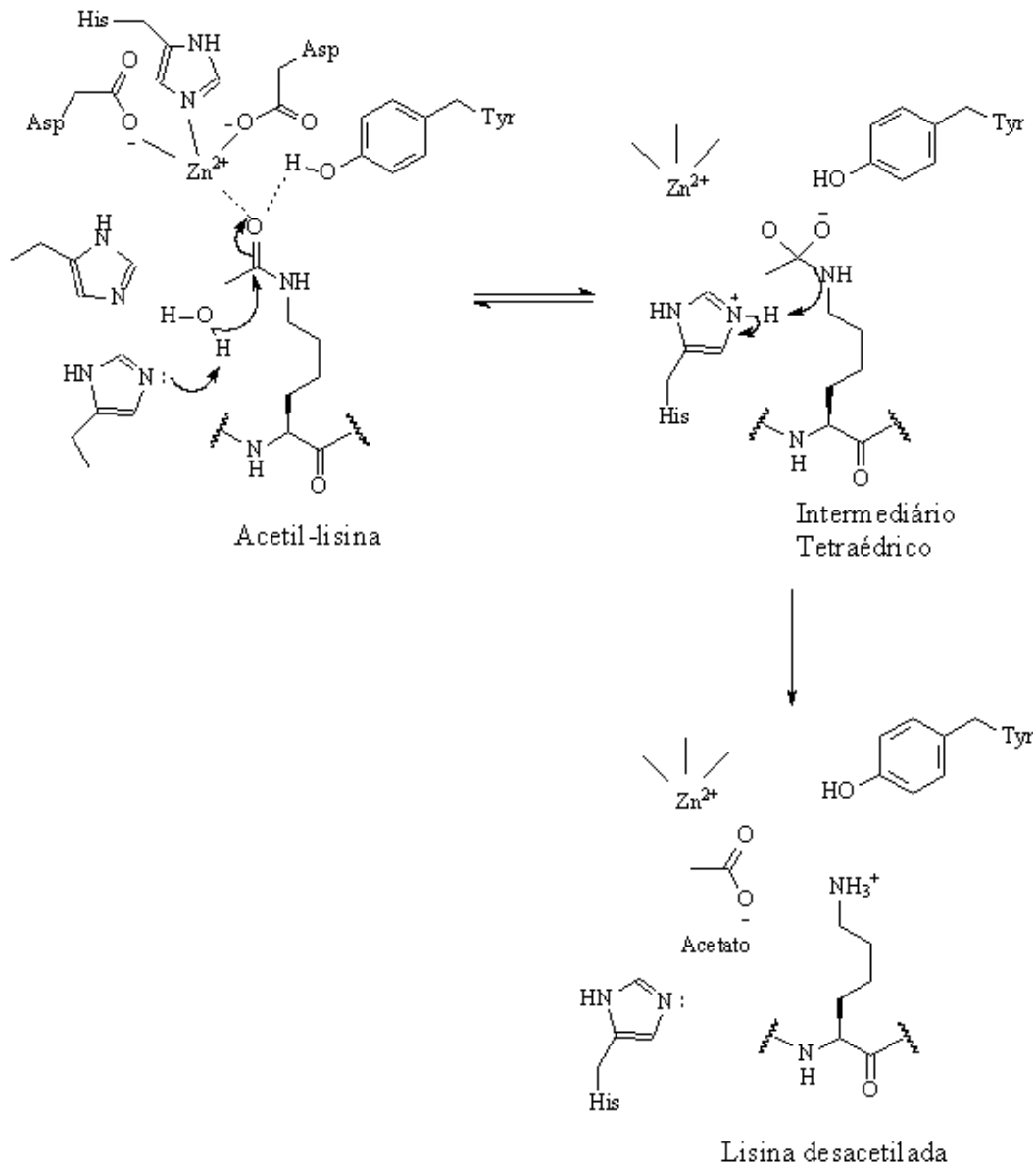


Figura 11 Desacetilação da cadeia lateral da lisina na proteína histona promovida pela enzima Histona Deacetilase

As histonas deacetilase são enzimas que removem os grupos acetil introduzidos covalentemente pelas enzimas histonas acetil-transferases. A histona deacetilase é uma metalo capaz de promover a hidrólise dos grupos acetil-lisina (figura 11). As enzimas histona acetil-transferase e Histona Deacetilase controlam assim o nível de acetilação das histonas .

3.4 Histonas e o *Trypanosoma cruzi*.

O genoma dos tripanossomas possui aproximadamente o tamanho de 58 Mb (variando entre as linhagens) distribuído em 28 cromossomos os quais codificam aproximadamente 12.000 proteínas. O genoma é considerado principalmente diplóide, embora grandes variações de tamanho sejam observadas entre os cromossomos homólogos.

Os nucleossomos do *T. cruzi* possui quatro histonas. As proteínas histonas nos *T. cruzi* mostram, assim como as histonas dos eucariotos, um padrão de acetilação em regiões que expressam proteínas e metilação em regiões silenciadas do ADN, muito embora este padrão de acetilação tenha diferenças marcantes daquele observado em células eucariotas de mamíferos.⁴² Modificações pós-translacionais das histonas também têm sido relatadas em *Trypanosomas brucei* o agente etiológico da doença do sono, com alta incidência no continente africano.⁴³ Curiosamente, enquanto as histonas são proteínas altamente conservadas em eucariotos superiores, os *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* apresentam sequências bastante divergentes destas proteínas.⁴³ Os tripanossomas também possuem uma atípica H1 sem o domínio globular. Outras diferenças entre as histonas dos tripanossomas e as de mamíferos incluem a ausência da histona conservada H3 muito embora possuam uma variante chamada H3V. Nos tripanossomas, também está ausente a histona H2A.X que em células de mamíferos está envolvida na replicação, meiose, recombinação, reparo e apoptose, havendo, entretanto, uma histona homóloga, a H2A.Z.³³

O nível de condensação da cromatina varia bastante ao longo do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. No estágio de vida do *T. cruzi* no inseto-vetor Triatomídeo, há um aumento na condensação da cromatina. Já se observou que o nível de condensação da cromatina é maior na forma não-replicativa tripomastigota do que na forma replicativa amastigota e na forma epimastigota (no inseto vetor).^{44; 33}

3.5 Inibidores de Histona Deacetilase

Os Inibidores de histona deacetilase são moléculas pequenas capazes de promover uma hiperacetilação da histona impedindo o silenciamento de genes ativos.³⁷

Quimicamente, os inibidores de histona deacetilase podem ser divididos em quatro grupos: ácidos graxos de cadeia curta; ácidos hidroxâmicos, peptídeos cíclicos e benzamidas.⁴⁵ O mecanismo de inibição destes compostos, com exceção dos ácidos carboxílicos, envolve a quelação do zinco no sítio ativo da enzima histona deacetilase.⁴⁵ O mecanismo de atividade do ácido butírico, entretanto, parece ser distinto uma vez que há evidências de que a inibição da enzima histona deacetilase, promovida por este ácido carboxílico, é não-competitiva (alostérica).⁴⁶

Outras metaloproteínas de zinco participam de processos importantes nos organismos de mamíferos e servem como similares para comparação do mecanismo de catálise e inibição enzimática da histona deacetilase. As metaloproteínas da matriz (endopeptidases de zinco capazes de degradar e remodelar elementos da matriz extracelular) são exemplos destas enzimas. Assim como as histonas deacetilases, estas enzimas são inibidas por ácidos hidroxâmicos por via competitiva em um sítio ativo hidrofóbico.⁴⁷

Os inibidores de histona deacetilase têm demonstrado várias atividades tais como: indução de apoptose celular pela indução da expressão de genes apoptóticos como o gene p53, indução de morte celular pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (“radicais livres”), indução de diferenciação celular, inibição e danos à progressão da mitose celular, etc.⁴⁸ A atividade anti-neoplásica destes compostos são muito estudadas devido à sua capacidade de induzir seletivamente a apoptose de células tumorais, tendo um efeito relativamente pequeno sobre células saudáveis. Uma série de outros processos também toma parte na atividade desta classe de compostos (desde a modulação da expressão de genes oncosuppressores, como o p53, até a inibição da angiogênese em tecidos neoplásicos). O mecanismo de indução de apoptose é bastante complexo envolvendo a atividade das enzimas caspase³¹ e Akt (proteína quinase B). Alguns estudos sugerem também que o envolvimento da atividade de proteínas fosfatases no controle da apoptose.^{49-52.}

A descoberta da atividade inibitória de ácidos carboxílicos de cadeia curta, como ácido valpróico e ácido butírico sobre a enzima Histona Deacetilase motivou uma ampla investigação dessa classe de compostos.⁵³⁻⁵⁵ Teste com pró-drogas já estão sendo realizados com o butirato.⁵³ De fato, o Pivanex (pivaloioximetilbutirato) é um medicamento

já testado contra câncer de pulmão ⁵⁶ que tem mostrado uma eficiência aceitável para aplicações médicas.

A investigação de atividade farmacológica dos inibidores de histona deacetilase sobre as neoplasias motivou uma ampla investigação de sua atividade em várias patologias.¹⁵ Estes inibidores revelaram atividade antimicrobiana, antiviral e antiparasítica (contra protozoários). De fato, foi identificada atividade contra *Leishmania*, *P. falciparum*, *Toxoplasma gondii* entre outros.⁵⁷ Já há alguns derivados Do composto *apicidin* (Figura 12) , um inibidor de histona deacetilase bastante investigado para o tratamento de malária e leishmaniose, patenteado pelo laboratório MERCK.⁵⁸

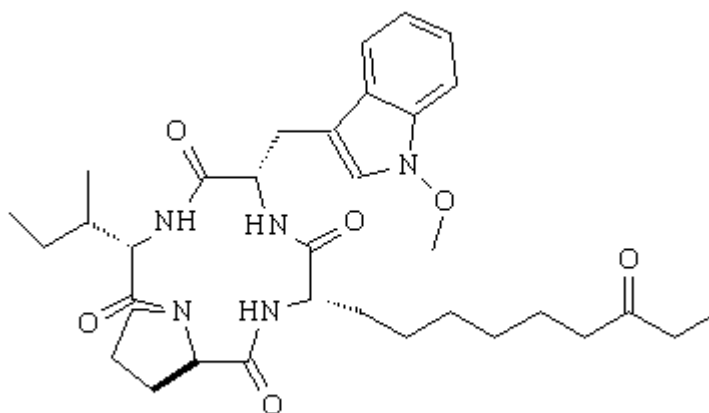


Figura 12 Estrutura da Apicidin

3.6 Mecanismos de Inibição Enzimática

Há dois mecanismos básicos pelos quais uma enzima pode ser inibida por uma molécula pequena: por mecanismo competitivo ou alostérico. A inibição competitiva corresponde a inibição da atividade enzimática por um inibidor que mimetiza as propriedades do substrato natural da enzima reduzindo assim o número das enzimas ligadas ao substrato. Na inibição alósterica, por outro lado, o inibidor liga-se a um sítio próximo da cavidade ligante levando a uma alteração morfológica do mesmo que inibe a atividade enzimática. É importante destacar que no mecanismo alostérico, a inibição permite que a enzima ligue-se simultaneamente ao substrato e ao inibidor.⁵⁹ Diferentemente da inibição alostérica, a

inibição competitiva pode ser anulada por uma concentração suficientemente elevada de substrato.

Capítulo 4

Ácidos Hidroxâmicos

A habilidade dos ácidos hidroxâmicos de quelar metais deve-se, em grande parte, a estrutura tautomérica de seu ânion, envolvendo as formas ceto e iminol desta espécie química. Este ácido tem capacidade de se ligar (“quelação”) não apenas a metais, mas compostos não metálicos também (tais como o ácido bórico). A capacidade de quelação de ácidos hidroxâmicos é bastante afetada por efeito do solvente devido à solvatação a qual favorece a ionização.⁶⁰ Ácidos hidroxâmicos podem se dissociar tendo o nitrogênio ou o oxigênio ácido. Ionizado apresenta-se na forma ceto ou iminol podendo estar na configuração E ou Z (Figura 13). O ângulo diedral do grupo hidroxâmico é de aproximadamente 5,4°. A substituição de átomos de hidrogênio na cadeia carbônica deste ácido altera a conformação (E ou Z) e a forma tautomérica preferencial (ceto ou iminol).

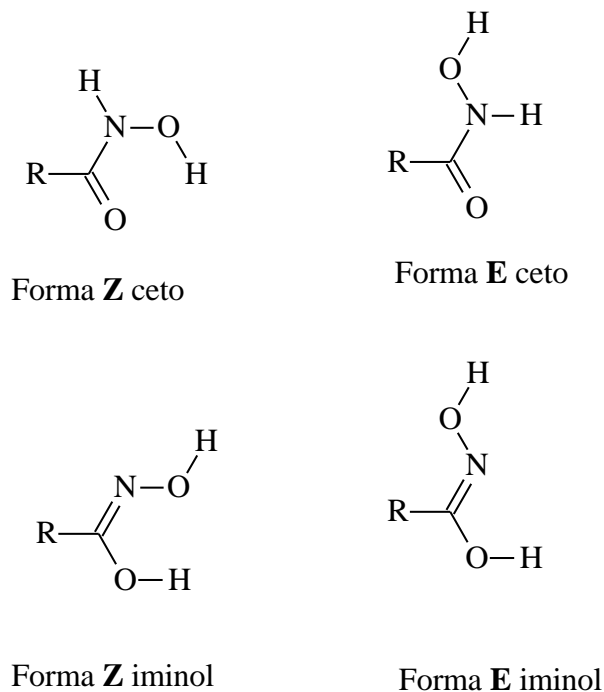


Figura 13 Formas tautoméricas do ácido hidroxâmico

Segundo cálculos semiempíricos (AM1 e PM3) e **ab initio** (HF/MP2 em nível 3-21G, 3-21G(d), 6-31G (d,p) e 6-311G(d,p)) a forma **Z** favorece a redução da energia destes ácidos na presença de grupos substituintes metil (provavelmente, devido ao efeito indutivo), ciano e benzil.⁶¹ O isômero **E** da forma tautomérica ceto apresenta uma forte ligação de hidrogênio intramolecular (cerca de 1,9 Å segundo cálculos **ab initio**). De fato, em alguns ácidos hidroxâmicos esta ligação de hidrogênio é forte o suficiente para torna o isômero **Z** mais estável do que o **E**, ao contrário da ligação peptídica onde a forma **E** é favorecida⁶¹. Estudos sugerem que a forma ceto é favorecida em solventes polares enquanto a forma iminol é favorecida em solventes apolares. O método MP2 e o DFT demonstram diferenças quanto à estabilidade dos tautômeros do ácido hidroxâmico embora ambos os métodos indiquem a estabilidade do isômero **Z**. A pequena diferença de energia sugere que todas as formas podem estar presentes em solvente comuns. Substituintes também podem favorecer a forma iminol. Evidências experimentais e teóricas demonstram que a substituição de um flúor pelo grupo metil na molécula do ácido fluorhidroxâmico torna a forma iminol mais estabilizada em relação à forma ceto.⁶² Embora seja teoricamente possível um ácido hidroxâmico na forma zwitteriônica, as evidências experimentais e teóricas indicam que o zwitterion deste ácido é bastante instável e converge rapidamente para a forma aniônica. Entretanto, o substituinte betaína (o ácido betainohidroxâmico) é uma exceção permitindo a estabilização do íon na forma zwitteriônica.

Admite-se que a forma aniônica dos ácidos hidroxâmicos ocorra pela deprotonação do hidrogênio do grupo OH, há evidências teóricas e experimentais de que o nitrogênio também possui a mesma capacidade de deprotonação havendo variação na forma de deprotonação de acordo com o solvente utilizado. Na fase gasosa, a forma deprotonada no nitrogênio é favorecida (segundo alguns estudos, o “N-anion” possui uma energia livre de Gibbs 40 kJ/mol menor do o ânion deprotonado no átomo de oxigênio). Esta diferença de energia é significativamente reduzida em meio aquoso, embora o isômero **Z** da forma deprotonada no nitrogênio ainda seja favorecido. A primeira camada de hidratação sobre o íon hidroxamato compreende cinco a seis moléculas de água sendo que há aproximadamente seis a sete ligações de hidrogênio envolvidas. Estas ligações ocorrem preferencialmente no átomo de oxigênio na espécie com o nitrogênio deprotonado e carga parcial negativa. O cluster, isto é o íon hidroxamato juntamente com a sua esfera de hidratação, torna a forma iônica

deprotonada no oxigênio mais favorecida com o aumento no número de moléculas de água. Íons hidroxamatos deprotonados no átomo de oxigênio são altamente coordenados por moléculas de água em comparação com os íons deprotonado no átomo de nitrogênio, o que explica sua elevada estabilidade no meio aquoso.⁶³

Embora os ácidos hidroxâmicos sejam bem descritos como inibidores competitivos, visto que estes se ligam ao zinco da cavidade ligante formando um complexo ligante, a inibição promovida pelo ácido butírico ainda não é um consenso, embora seja aceito que os ácidos carboxílicos de cadeia curta também inibem as enzimas histonas deacetilase de forma competitiva.

Neste trabalho, pretende-se demonstrar também que há uma série de alterações introduzidas pelos ácidos carboxílicos de cadeia curta que podem ser responsáveis, em conjunto, pela inibição da histona deacetilase. Alguns estudos recentes têm revelado evidências do mecanismo de inibição da histona deacetilase.⁶⁴ Estes estudos demonstraram que a substituição de algumas posições na cadeia carbônica do ácido butírico com os grupos amino ($-NH_2$) e hidroxil ($-OH$) reduzem a atividade inibitória deste composto sobre a HDAC⁶⁴. Substituintes alquil também reduzem a capacidade de inibição da histona deacetilase pelos ácidos carbônicos de cadeia curta (Figura 14).

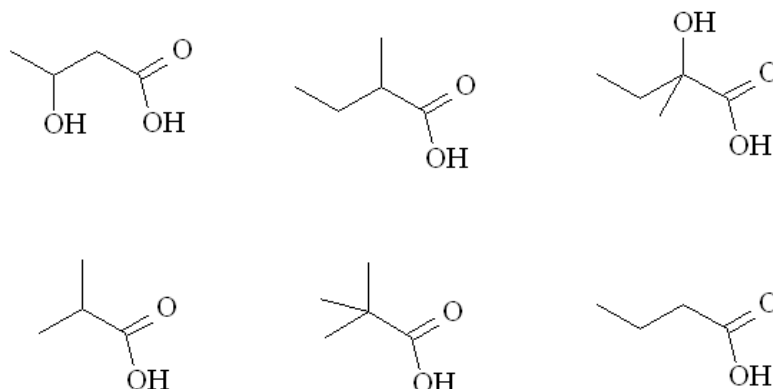


Figura 14 Análogos do ácido butírico sem atividade sobre a HDAC ou com atividade reduzida

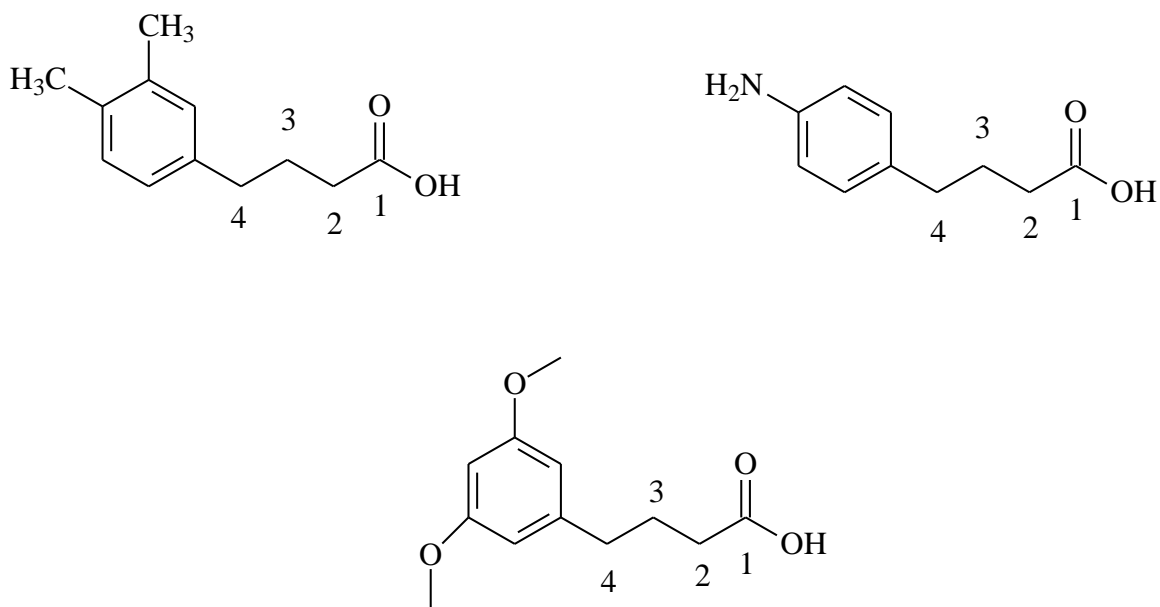


Figura 15 Análogos do ácido butírico com atividade igual ou superior sobre a HDAC.

Entretanto, a substituição de grupos aromáticos na posição 4- da cadeia do ácido butírico mantém ou até mesmo favorece esta atividade inibitória (Figura 15). Estes resultados evidenciam, portanto, a importância do volume molecular e da polaridade dos ácidos carbônicos de cadeia curta na inibição da HDAC. O aumento na atividade inibitória dos ácidos carboxílicos de cadeia curta contendo anéis aromáticos substituintes também revela uma contribuição importante de interações envolvendo a densidade eletrônica presente na nuvem aromática destes compostos com possível participação de interações de *stacking*.

Capítulo 5

Ácidos Borônicos

Ácidos borônicos são compostos orgânicos contendo boro que possuem um grupo alquil substituinte, ou seja, uma ligação Carbono-Boro, e dois grupos hidroxila preenchendo as valências restantes do átomo de boro. Diferente dos ácidos carboxílicos, estes compostos não são encontrados na natureza. A primeira síntese de um ácido borônico foi descrita por Frankland em 1860. A maioria dos ácidos borônicos existe como sólidos cristalinos. A pesquisa sobre a química de ácidos borônicos aumentou significativamente nos últimos anos inclusive com a aprovação do primeiro medicamento contendo um ácido borônico como princípio ativo, o VELCADE (bortezomib), um agente anti-câncer (Figura 16).⁶⁵

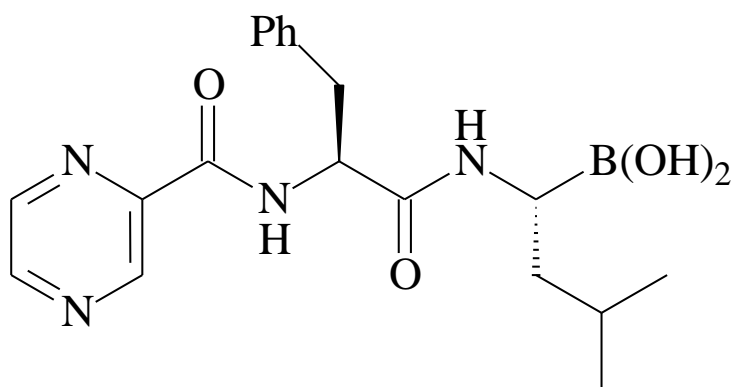


Figura 16 Estrutura do Bortezomib

Com seis elétrons de valência (ou seja, sendo deficiente em dois elétrons) o átomo de boro possui um orbital “*p*” vazio. Este orbital é ortogonal aos três substituintes que estão orientados em uma geometria trigonal planar. Para completar o octeto, ácidos borônicos e seus ésteres podem coordenar moléculas básicas e formar um aduto tetracoordenado. De fato, estudos de cristalografia usando Raios-X sobre a estrutura do aduto do ácido fenilborônico com a dietanolamina confirmaram a existência de uma 'ponte Nitrogênio-Boro' formada por uma ligação covalente coordenada com o comprimento de 1,67 Å (Figura 17). Esta ligação induz um forte momento de dipolo $N^{\delta+}-B^{\delta-}$. A deficiência eletrônica do átomo

de boro nos ácidos borônicos é parcialmente compensada pelos dois átomos de oxigênio doadores de elétrons.⁶⁵

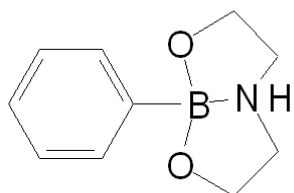


Figura 17 “Ponte N-B” no aduto do ácido fenil-borônico com a dietanolamina

O caráter ácido dos ácidos borônicos deriva essencialmente do orbital “p” vazio, tornando estes compostos capazes de se coordenar a moléculas ricas em densidade eletrônica, dando a eles um comportamento de ácidos de Lewis. O aduto tetraédrico resultante adquire uma configuração semelhante à do carbono (Figura 18). Quando ligado com um ligante aniônico, embora a carga negativa seja posta no desenho da fórmula de Lewis como uma carga sobre o carbono, na verdade, esta carga fica distribuída sobre os três heteroátomos.⁶⁵

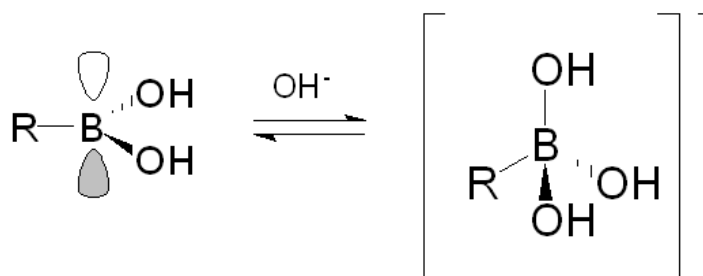


Figura 18 O caráter ácido de Lewis dos ácidos borônicos

Os ésteres borônicos, por analogia com os ésteres de ácidos carboxílicos, são ácidos borônicos nos quais o grupo hidroxila está substituído por grupos alcooxi ou ariloxi. Ésteres de ácidos borônicos são menos polares do que os ácidos borônicos e, normalmente, possuem manipulação fácil. A maioria dos ésteres borônicos possui baixo peso molecular e são líquidos à temperatura ambiente.⁶⁵ Uma característica importante destes ésteres é sua capacidade de atravessar membranas lipídicas o que os torna excelentes pró-drogas de

medicamentos borônicos, pois podem produzir uma boa biodisponibilidade intracelular do ácido borônico.^{66,66}

Alguns estudos sobre efeito inibitório de ácidos borônicos sobre enzimas demonstraram que estes compostos possuem uma atividade elevada. O ácido fenil-borônico é capaz de inibir colinesterase humana em concentrações tão baixas quanto $4,0 \times 10^{-6}$ M.⁶⁷ Há também estudos mostrando a atividade inibitória de ácidos α -amino-borônicos sobre enzimas⁶⁸ e a inibição de acetil-colinesterase e quimiotripsina por ácidos borônicos.⁶⁷⁻⁷⁰ De fato, este bioisómero apresenta a capacidade de formar complexos ligando-se covalentemente a grupos hidroxilas.^{71,72} Alguns autores sugerem que a inibição ocorra por meio de um aduto covalente com o átomo de boro tetracoordenado na forma aniônica.^{68,69,70,73} Os ácidos borônicos têm a propriedade de sofrer uma rápida conversão de uma geometria trigonal planar neutra com o átomo de boro hibridizado em sp^2 para uma geometria tetraédrica aniônica com o átomo de boro hibridizado em sp^3 . Uma vez que o processo de clivagem de amida e ésteres requer a conversão de um carbono carbonílico hibridizado em sp^2 para um carbono tetraédrico com hibridização sp^3 , pode-se construir análogos dos substratos enzimáticos para a inibição de enzimas tais como peptidases/proteases, proteasoma, arginase, óxido nítrico sintetase (NOS), estereases etc.⁶⁵

A aplicação farmacológica dos ácidos borônicos vem sendo amplamente investigada, com vários exemplos de possíveis aplicações para tratamento de infecções por fungos,⁷⁴ combate à trombose durante procedimento cirúrgico,⁷⁵ anticoagulante,⁷⁶ inibidores de proteases,⁷⁷ imunossupressores^{78,79}. Embora os ácidos borônicos sejam compostos reativos (podem sofrer desboronação oxidativa no organismo pelo citocromo P450),⁸⁰ há trabalhos na literatura recente com a descrição de preparo de formulações de compostos desta classe para aplicações farmacológicas^{71,82}

Uma pesquisa recente revelou a atividade de ácidos borônicos análogos de ácidos hidroxâmicos na inibição de histona deacetilase.⁸³ Os ácidos hidroxâmicos, diferentemente do ácido butírico, promovem a inibição da histona deacetilase por via competitiva inibindo o sítio ativo da enzima por quelação do íon zinco divalente presente naquele sítio. O ácido butírico, entretanto, como já foi destacado anteriormente, parece comportar-se como um inibidor alostérico. Portanto, a simulação da atividade de análogos do ácido butírico possui dois grandes obstáculos: o fato de não haver programas de modelagem molecular com

parametrização adequada para simulação de compostos de boro, o que exige a combinação de estudos de mecânica-quântica com mecânica clássica para uma simulação satisfatória (estudos QM-MM) e a ausência de descrição experimental do sítio alostérico, o que torna necessário um estudo profundo de modelagem para a indicação da provável cavidade ligante da molécula.

Embora existam estudos mecanísticos oriundos da combinação de simulação computacional com dados experimentais,^{84,85} a pesquisa dos mecanismos de atuação destes compostos dependem de fundamentos teóricos e experimentais mais profundos, assim, optamos por testar experimentalmente os análogos em estudo antes de iniciar uma abordagem teórica mais adequada.

Capítulo 6

Fundamentos Teóricos da Simulação Computacional

6.1 A Teoria do Funcional da Densidade (DFT)

Atualmente, a simulação computacional permite uma avaliação mais precisa das interações fármaco-proteína, por meio da mecânica molecular (“*docking*”) e do cálculo quântico (**ab initio**).

No início do séc. XX, a introdução por Bohr do modelo quantizado do átomo permitiu a aplicação do conceito de estados estacionários a átomos e moléculas. A descrição das propriedades ondulatórias das partículas por de Broglie e o modelo de Bohr levantaram a possibilidade de estudo de partículas por meio da mecânica ondulatória. Em 1922, Schrödinger postulou uma equação de autovalores para a qual seria possível obter-se o valor de energia e outras informações do estado estacionário de átomos e moléculas. A energia pode ser obtida a partir da equação de onda de Schrödinger, a qual, na forma independente do tempo, não-relativística, com a aproximação de Born-Oppenheimer pode ser escrita como:

$$H\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) = E\Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) \quad \text{Eq. 1}$$

Onde \hat{H} é o operador que fornece o valor da energia molecular total, chamado Hamiltoniano, Ψ é a função de onda dos estados eletrônicos e E representa os valores de energia permitidos dos respectivos estados, ou seja, os estados estacionários, para o sistema. O operador Hamiltoniano, H, consiste de uma soma de três termos: a energia cinética (T_e), a interação com o potencial externo (V_{ext}) e a interação elétron-elétron (V_{ee}) (equação 2)

$$\hat{H} = -1 \frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 + \hat{V}_{ext} + \sum_{i < j}^N \frac{1}{|r_i - r_j|}$$

Energia Potencial Repulsão
 cinética Externo elétron-elétron

Eq. 2

Na simulação de materiais de interesse, o potencial externo corresponde à interação dos elétrons com os núcleos atômicos (Equação 3)

$$\hat{V}_{ext} = - \sum_{\alpha}^{Nat} \frac{Z_{\alpha}}{|r_i - R_{\alpha}|}$$

Eq.3

Onde r_i é a coordenada do elétron i e a carga do núcleo em R_{α} é Z_{α} . O menor autovalor de energia, E_0 , é a energia do estado fundamental e a densidade de probabilidade de encontrar um elétron com um conjunto particular de coordenadas $\{r_i\}$ é $|\Psi_0|^2$.

A energia média total para um estado especificado por um Ψ particular é o valor esperado de H (Equação 4)

$$E \Psi = \int \Psi^* \hat{H} \Psi dr \equiv \langle \Psi | \hat{H} | \Psi \rangle$$

Eq. 4

O termo $[\Psi]$ enfatiza que a energia é um funcional da função de onda. A energia é maior do que aquela do estado fundamental a menos que Ψ corresponda a Ψ_0 , que é o teorema variacional (Equação 5)

$$E \Psi \geq E_0$$

Eq. 5

A função de onda do estado fundamental e a energia podem ser encontrada pela busca de todas as possíveis funções de onda para as que minimizam a energia total.

Em 1928, Hartree propôs um modelo para solucionar problemas de sistemas multi-eletrônicos. Utiliza-se o operador de Fock em substituição ao Hamiltoniano. A teoria de Hartree-Fock consiste de uma extensão para a estrutura de Ψ – considera-se que esta é o

produto antissimétrico de funções ϕ_i cada uma das quais depende da coordenada de um único elétron (Equação 6)

$$\Psi_{HF} = \frac{1}{\sqrt{N!}} \det[\phi_1 \phi_2 \phi_3 \dots \phi_N] \quad \text{Eq. 6}$$

Onde *det* indica o determinante da matriz. A substituição desta expansão para Ψ na equação de schrödinger resulta na expressão para energia Hartree-Fock (Equação 7)

$$\begin{aligned} E_{HF} = & \int \phi_i^* r \left(-\frac{1}{2} \sum_i^N \nabla_i^2 + V_{ext} \right) \phi_i(r) dr \\ & + \frac{1}{2} \sum_{i,j}^N \int \frac{\phi_i^*(r_1) \phi_i(r_1) \phi_j^*(r_2) \phi_j(r_2)}{|r_i - r_j|} dr_1 dr_2 \\ & - \frac{1}{2} \sum_{i,j}^N \int \frac{\phi_i^*(r_1) \phi_j^*(r_1) \phi_j(r_2) \phi_i(r_2)}{|r_i - r_j|} dr_1 dr_2 \end{aligned} \quad \text{Eq. 7}$$

O segundo termo corresponde á energia de Coulomb clássica escrita em termos de orbitais e o terceiro termo é a energia de troca. Os orbitais nos estados fundamentais são determinados pela aplicação do teorema variacional para esta expressão de energia sob a restrição de que os orbitais sejam ortonormais. Isto leva às equações Hartree-Fock (ou SCF)(Equação 8)

$$\left[-\frac{1}{2} \nabla^2 + v_{ext}(r) + \int \frac{\rho(r')}{|r - r'|} dr' \right] \phi_i(r) + \int v_x(r, r') \phi_i(r') dr \quad \text{Eq. 8}$$

Onde o potencial de troca não local, v_x , é tal que:

$$\int v_x(r, r') \phi_i(r') dr = - \sum_j^N \int \frac{\phi_i(r) \phi_j^*(r')}{|r - r'|} dr' \quad \text{Eq. 9}$$

Deste ponto de partida com aproximações melhores (métodos correlacionados) os valores de Ψ e E_0 podem ser obtidos rapidamente, mas o custo computacional é muito elevado e é escalonado proibitivamente como número de elétrons tratados. Além disso, soluções exatas requerem uma descrição muito flexível da variação espacial da função de onda, um conjunto grande de bases é necessário e o que também adiciona custo para os cálculos práticos.

O operador de Hamiltonian (Equação 2) consiste em um único elétron e interações bi-elétrônicas – isto é operadores que envolvem apenas as coordenadas de um ou dois elétrons. O conhecimento da densidade de probabilidade de duas-partículas – que é, a probabilidade de achar um elétron em r_1 e um elétron em r_2 - é suficiente.

Uma quantidade muito utilizada para analisar a expressão de energia é a matriz de densidade de segunda ordem, que é definida como:

$$P_2(r_1, r_2; r_1, r_2) = \frac{N(N-1)}{2} \int \Psi^*(r_1', r_1', \dots, r_N') \Psi(r_1, r_2, \dots, r_N) dr_3, dr_4, \dots, dr_N \quad \text{Eq. 10}$$

Os elementos diagonais de P_2 , frequentemente referidos como a matriz densidade de duas-partículas ou densidade do par, são;

$$P_2(r_1, r_2) = P_2(r_1, r_2; r_1, r_2) \quad \text{Eq. 11}$$

A matriz densidade de primeira ordem é definida de uma maneira semelhante e pode ser escrita em termos de P_2 como;

$$P_2(r_1', r_1) = \frac{2}{N-1} \int P_2(r_1', r_2; r_1, r_2) dr_2 \quad \text{Eq. 12}$$

Dada P_1 e P_2 a energia total pode determinada exatamente

$$E = tr(\hat{H}\hat{P}) = \int \left[\left(-\frac{1}{2} \nabla_1^2 - \sum_{\alpha}^{Nat} \frac{Z_{\alpha}}{|r_1 - R_{\alpha}|} \right) P_1(r_1', r_1) \right]_{r_1=r_1'} dr_1 + \int \frac{1}{|r_1 - r_2|} P_2(r_1, r_2) dr_1 dr_2 \quad \text{Eq. 13}$$

Os elementos diagonais matrizes densidade de primeira e segunda ordem determinam a energia total. Para a solução plena da equação de Schrödinger é suficiente determinar P_1 e P_2 - e o problema num espaço de coordenadas 3N é reduzido a um problema num espaço de 6 dimensões.

A Teoria do Funcional da Densidade mostra que não é necessário P_2 para achar E – a energia do estado fundamental é determinada completamente pelos elementos diagonais da matriz densidade de ordem primeira ordem – a densidade de carga.

6.1.1 Os Teoremas de Hohenburg-Kohn

Em 1964 Hohenburg e Kohn provaram dois teoremas. O primeiro teorema pode ser declarado da seguinte forma:

“A densidade eletrônica determina o potencial externo (dentro de uma constante aditiva).”

Se esta declaração é verdadeira, então imediatamente segue que a densidade eletrônica excepcionalmente determina o operador de Hamiltonian (Equação 2). Como o Hamiltonian é especificado pelo potencial externo e o número total de elétrons, N, pode ser computado a partir da densidade simplesmente pela integração sobre todo o espaço.

Hohenburg e Kohn deram uma prova clara deste teorema, que foi generalizada para incluir sistemas com estados degenerados em uma prova dada por Taxa em 1979. Observa-se que a densidade eletrônica excepcionalmente determina as posições e cargas dos

núcleos e assim trivialmente determina o Hamiltonian. O primeiro teorema pode ser resumido dizendo que a energia é um funcional da densidade – $E[\rho]$.

O segundo teorema estabelece um princípio variacional; Para qualquer densidade de definida positiva, ρ_t , tal que $\int \rho_t(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = N$, então $E[\rho_t] \geq E_0$.

Os dois teoremas levam ao princípio fundamental da Teoria do Funcional da Densidade

$$\delta \left[E[\rho] - \mu \left(\int \rho(\mathbf{r}) - N \right) \right] = 0 \quad \text{Eq. 14}$$

A energia do estado fundamental e densidade correspondem ao mínimo de algum funcional $E[\rho]$ sujeita à restrição de que a densidade contenha o número correto de elétrons. O multiplicador de Lagrange desta restrição é o *potencial químico* eletrônico μ . Há, portanto, um “Funcional universal” $E[\rho]$, isto é, independente do potencial externo e que representa o sistema de interesse. Este, se conhecida sua forma, pode ser inserido na equação acima e minimizado para obter exatamente a densidade e a energia do estado fundamental.

6.1.2 A Carga ChelpG

As funções de onda Hartree-Fock não permitem obter os valores de carga atômica diretamente de sua resolução. Para se estimar estes valores, utiliza-se meio indiretos, a partir da mensuração de outras propriedades físicas. O método mais simples de se utilizar é a Análise de População de Mulliken. Entretanto, este método é bastante sensível à base utilizada. O método de ChelpG⁹⁰ (Charges from Electrostatic Potential Grid) é considerado mais apropriado por ser mais independente da base. Esse método baseia-se nos valores do potencial eletrostático, propriedade obtida diretamente do cálculo SCF pela equação:

$$V(\mathbf{r}) = \frac{Z_A}{|\mathbf{r} - \mathbf{R}_A|} - \sum P_{\mu\nu} \int \frac{\varphi_\mu \varphi_\nu}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} d\mathbf{r}' \quad \text{Eq. 15}$$

Onde Z_A é a carga nuclear sobre o átomo A, centrado em R_A , $P_{\mu\nu}$ é o elemento da matriz densidade determinado a partir do procedimento Hartree-Fock, e φ_μ , φ_ν são as funções de bases utilizadas.⁹⁰ No método ChelpG, basicamente, se atribui a cada átomo uma carga pontual derivada de uma “grade” construída com base no potencial eletrostático. Nos cálculos realizados neste trabalho, utilizamos a carga ChelpG e optamos, na maioria dos resultados, pela base 6-31G*. Esta base, normalmente, produz valores razoáveis de energia em moléculas orgânicas e possui um custo computacional mediano⁹¹.

Em alguns casos utilizamos outras bases (como STO-3G*) para fazermos uma análise comparativa. Na avaliação da cavidade ligante dos inibidores, as cargas foram determinadas a partir do campo de força AMBER⁸⁹ (Assisted Model Building and Energy Refinement) do programa PyMol. Este campo de força foi parametrizado com cargas atômicas obtidas através do método de potencial eletrostático.⁸⁹

Para os cálculos de ligação de hidrogênio e de interações de complexos optou-se pelo método do Funcional da Densidade. Alguns estudos sugerem que abordagem Hartree-Fock para a Ligação de hidrogênio pode gerar estruturas imprecisas. Para melhorar o desempenho desta abordagem normalmente adota-se métodos que incluem a correlação eletrônica (como o Møller-Plesset MP2). O maior problema associado ao uso desta abordagem é o custo computacional o que limita o tamanho dos sistemas estudados à moléculas muito pequenas. O método do Funcional da Densidade (DFT) se mostra mais adequado. O tempo computacional requerido aumenta com N^3 (sendo N o número de funções de base) enquanto para outros métodos **ab initio** aumenta com N^5 . Além disso, o DFT é menos sensível a variação nas funções base na previsão de ligações de hidrogênio e, combinado com o método híbrido B3LYP, reproduz com bastante exatidão os resultados MP2 e em boa concordância com resultados experimentais.⁹²

6.2 Dinâmica Estocástica

Dinâmicas moleculares (DM) clássicas resolvem as equações de Newton para o movimento:

$$\dot{x}_i(t) = v_i(t) \tag{Eq. 16}$$

$$m_i \dot{v}_i = F_i(\{x_i(t)\}) \quad \text{Eq. 17}$$

Para um sistema de N partículas. O índice i identifica partículas e componentes cartesianos ($i = 1, 2, \dots, 3N$). A coordenada x , y ou z de uma partícula é denotada por x_i , sua massa por m e o componente cartesiano da velocidade por v . A força sistemática F_i deriva de um campo de força conservativo $V(\{x_i\})$

$$F_i(t) = -\frac{\partial}{\partial x_i} V(\{x_i(t)\}) \quad \text{Eq. 18}$$

Esta função potencial V descreve a interação entre as partículas o qual depende, normalmente, das coordenadas de todas as partículas denotadas por $\{x_i(t)\}$.

Quando um sistema grande é simulado, deseja-se geralmente manter o número de graus de liberdade tão baixo quanto possível. Quando um certo subconjunto de partículas (identificadas pelo índice α) pode ser distinguido, dos quais os detalhes de seus movimentos não relevantes, essas partículas podem ser omitidas a partir da simulação (DM). Entretanto, as forças que eles exercem sobre as partículas remanescentes (marcadas pelo índice i) devem ser representados de forma tão fiel quanto possível. Isso significa que a correlação de tais forças com as posições e velocidades da partícula i devem ser incorporadas nas equações de movimento da partícula i , enquanto contribuições não correlacionadas podem ser representadas por forças randômicas. Isto nos leva ao campo da *Dinâmica Estocástica* (DE).

Parte da influência das partículas α sobre as partículas i podem ser incluídas no campo de força $V(\{x_i\})$. Se o potencial ou campo de força $V(\{x_i, x_\alpha\})$ é uma média de um conjunto em equilíbrio de partículas α , um potencial de força principal é obtido.

$$V_m(\{x_i\}) = \langle V(\{x_i, x_\alpha\}) \rangle \quad \text{Eq. 19}$$

O campo de força V_m para as partículas i agora inclui a interação média com partículas α . As partes correlacionadas a velocidade e randômicas das forças exercida pelas partículas α sobre as partículas i modificam as equações de movimento das últimas. As forças randômicas estão relacionadas às forças de fricção dependente de velocidade pelo segundo teorema da flutuação-dissipação.

O caso mais simples de DE assume-se não existir nenhuma correlação entre os vários níveis de graus de liberdade. Sob estas condições a força friccional dependente da velocidade torna-se proporcional à velocidade instantânea da partícula envolvida. Assim, a segunda equação do movimento é transformada na equação estocástica:

$$m_i v_i(t) = F_i(\{x_i(t)\}) - m_i \gamma_i v_i(t) + R_i(t) \quad \text{Eq. 20}$$

O coeficiente de fricção de uma partícula é denotado por γ_i e a força randômica por R_i . Assume-se que a força estocástica $R_i(t)$ é uma variável randômica Gaussiana estacionária com zero principal e sem ter correlação com as velocidades anteriores o com a força sistemática:

$$\langle R_i(0)R_j(t) \rangle = 2m_i \gamma_i kT_{ref} \delta_{ij} \delta(t) \quad \text{Eq. 21}$$

$$W(R_i) = \left[2\pi \langle R_i^2 \rangle \right]^{-1/2} \exp \left\{ -R_i^2 / (2 \langle R_i^2 \rangle) \right\} \quad \text{Eq. 22}$$

$$\langle R_i \rangle = 0, \quad \text{Eq. 23}$$

$$\langle v_i(0)R_j(t) \rangle = 0, t \geq 0, \quad \text{Eq. 24}$$

$$\langle F_i(0)R_j(t) \rangle = 0, t \geq 0. \quad \text{Eq. 25}$$

Aqui $\langle \dots \rangle$ denota a média sobre um conjunto em equilíbrio, k é a constante de Boltzmann, T_{ref} é a temperatura de referência e $W(R_i)$ é a distribuição de probabilidade (Gaussiana) da força estocástica. A equação 20 difere da equação 17 apenas pela presença do termo friccional dependente de velocidade e do termo de força randômica. Isto significa que o algoritmo de DM desenhado para a integração das equações 16 e 17 pode ser generalizado para um algoritmo de DE pela integração das equações 16 e 20 se estas pertencerem aos métodos de integração aberta.

O algoritmo *leap-frog* consiste de duas equações:

$$v(t_n + \Delta t / 2) = v(t_n - \Delta t / 2) + m^{-1} F(t_n) \Delta t + O[(\Delta t)^3] \quad \text{Eq. 26}$$

e

$$x(t_n + \Delta t / 2) = x(t_n) + v(t_n + \Delta t / 2) \Delta t + O[(\Delta t)^3] \quad \text{Eq. 27}$$

A solução da equação diferencial de primeira ordem, não-homogênea, linear 20 produz

$$v(t) = v(t_n) \exp[-\gamma(t-t_n)] + m^{-1} \exp[-\gamma(t-t_n)] \int_{t_n}^t \exp[-\gamma(t_n-t')] \times F(t') + R(t') dt' \quad \text{Eq. 28}$$

Onde os índices denotam partículas e os componentes cartesianos foram omitidos. Desde que as propriedades estocásticas de $R(t')$ sejam conhecidas (equações 21 a 25), a integral sobre $R(t')$ pode ser obtida diretamente. A integral sobre $F(t')$ pode ser obtida pela expansão de $F(t')$ em uma série:

$$F(t) = F(t_n) + F'(t_n)(t-t_n) + O(t-t_n)^2 \quad \text{Eq. 29}$$

A derivada da força sistemática com respeito ao tempo em $t=t_n$ é denotada $F'(t_n)$. A expansão Eq. 29 é válida somente no limite dos coeficientes γ de fricção pequenos. A equação de Langevin (16) inclui além da força sistemática, dois termos extras: a força

friccional e a força randômica, a qual influenciará a dependência de $x(t)$ no tempo. Em valores de limites elevados de fricção os últimos termos dominaram a equação em 20, caso no qual a inclusão da derivada da força sistêmica não faria sentido. Desenvolvendo a integração na equação 28 temos:

$$\begin{aligned}
 v(t) = & v(t_n) \exp -\gamma(t-t_n) + m\gamma^{-1} F(t_n) [1 - \exp -\gamma(t-t_n)] \\
 & + m\gamma^2^{-1} F'(t_n) [\gamma(t-t_n) - 1 - \exp[-\gamma(t-t_n)]] \\
 & + m^{-1} \exp -\gamma(t-t_n) \int_{t_n}^t \exp[-\gamma(t-t_n)] R(t') dt' \\
 & + O[(t-t_n)^3]
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 30}$$

Integrando a velocidade sobre metade do tempo de uma etapa de t_n a $t_{n+1/2}=t_n+\Delta t/2$ nós encontramos

$$\begin{aligned}
 v(t_n + \Delta t / 2) = & v(t_n) \exp -\gamma\Delta t / 2 + (m\gamma)^{-1} F(t_n) [1 - \exp(-\gamma\Delta t / 2)] \\
 & + m\gamma^2^{-1} F'(t_n) [\gamma(\Delta t / 2) - [1 - \exp -\gamma(\Delta t / 2)]] \\
 & + m^{-1} \exp -\gamma(\Delta t / 2) \int_{t_n}^{t_n+\Delta t/2} \exp[-\gamma(t_n-t')] \\
 & \times R(t') dt' + O[(\Delta t)^3]
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 31}$$

Para o quarto termo, o qual corresponde a uma variável randômica, usa-se a notação:

$$V_n(\Delta t / 2) = m^{-1} \exp -\gamma(\Delta t / 2) \int_{t_n}^{t_n+\Delta t/2} \exp -\gamma(t_n-t') R(t') dt'
 \tag{Eq. 32}$$

Se escrevermos a equação 31 com $-\Delta t$ ao invés de Δt , multiplicando a equação obtida por $\exp[-\gamma\Delta t]$ e subtraí-la da equação 31, o termo envolvendo $v(t_n)$ é eliminado, encontramos:

$$\begin{aligned}
 v_n(t_{n+1/2}) = & v(t_n - 1 / 2) \exp(-\gamma\Delta t) + m^{-1} F(t_n) \Delta t (\gamma\Delta t)^{-1} [1 - \exp(-\gamma\Delta t)] \\
 & + V_n(\Delta t / 2) - \exp(-\gamma\Delta t) V_n(-\Delta t / 2) + O[(\Delta t)^3]
 \end{aligned}
 \tag{Eq. 33}$$

Onde o termo $F'(t_n)$ foi omitido, visto que este é um termo de terceira ordem em Δt . Quando $\gamma \rightarrow 0$, esta fórmula reduz a Equação 27 a qual é a fórmula da velocidade do algoritmo *leap-frog*. A posição é obtida pela integração da equação 16 no tempo:

$$t_{n+1/2} = t_n + \Delta t / 2$$

$$x(t) = x(t_n + 1/2) + \int_{t_{n+1/2}}^t v(t') dt'$$
Eq. 34

Se usarmos na equação 34 a fórmula 30 para $v(t')$ com t_n substituído por $t_{n+1/2}$, realizarmos as integrações e reduzirmos a integral dupla sobre $R(t')$ usando integração parcial, encontramos para $t=t_{n+1/2} + \Delta t/2$:

$$x(t_{n+1/2} + \Delta t / 2) = x(t_{n+1/2}) + v(t_{n+1/2}) \gamma^{-1} [1 - \exp(-\gamma \Delta t / 2) + (m\gamma^3)^{-1} F'(t_{n+1/2})]$$

$$x \left[\gamma (\Delta t / 2) - \left[1 - \exp -\gamma (\Delta t / 2) + (m\gamma^3)^{-1} F'(t_{n+1/2}) \right] \right]$$

$$x \left[1/2 (\gamma \Delta t / 2)^2 - \gamma \Delta t / 2 - 1 - \exp(-\gamma \Delta t / 2) \right] + (m\gamma)^{-1}$$
Eq. 35

$$x \int_{t_{n+1/2}}^{t_{n+1/2} + \Delta t/2} \left[1 - \exp -\gamma (t_{n+1/2} + \Delta t / 2 - t') \right] R(t') dt'$$

$$+ O[(\Delta t)^4]$$

Para o quinto termo da equação 35, que é uma variável randômica, usamos a notação:

$$X_{n+1/2}(\Delta t / 2) = (m\gamma)^{-1} \int_{t_{n+1/2}}^{t_{n+1/2} + \Delta t/2} \left[1 - \exp -\gamma (t_{n+1/2} + \Delta t / 2 - t') \right] R(t') dt'$$
Eq. 36

Se escrevermos a equação 35 com $-\Delta t$ ao invés de Δt e subtraí-la da equação Eq. 35, o termo envolvendo $X_{(n+1/2)}$ é eliminado e encontramos:

$$x(t_{n+1}) = x(t_n) + v(t_{n+1/2}) \Delta t (\gamma \Delta t)^{-1} [\exp(\gamma \Delta t / 2) - \exp(-\gamma \Delta t / 2)]$$

$$+ X_{n+1/2}(\Delta t / 2) - X_{n+1/2}(-\Delta t / 2) + O[(\Delta t)^3]$$
Eq. 37

Onde os termos envolvendo $F(t_{n+1/2})$ e $F'(t_{n+1/2})$ foram omitidos visto que estes são termos de terceira ordem em Δt . Quando $\gamma \rightarrow 0$, esta fórmula reduz a equação 27, que é a

fórmula coordenada do algoritmo *leap-frog*. Quando o algoritmo *leap-frog* D.E. Equações (32; 37) são usados, deve-se notar que $V_n(-\Delta t/2)$ está correlacionado com $X_{n-1/2}(\Delta/2)$, visto que estes são integrais diferentes no intervalo de tempo ($t_{n+1/2}$, t_n)

$$V_n(-\Delta t/2) = m^{-1} \int_{t_{n-1/2}}^{t_{n-1/2} + \Delta t/2} (-) \exp[-\gamma(t_{n-1/2} - t')] R(t') dt' \quad \text{Eq. 38}$$

$$X_{-1/2}(\Delta t/2) = (m\gamma)^{-1} \int_{t_{n-1/2}}^{t_{n-1/2} + \Delta t/2} [1 - \exp[-\gamma(t_{n-1/2} + \Delta t/2 - t')]] R(t') dt' \quad \text{Eq. 39}$$

A dinâmica estocástica pode ser utilizada no lugar da Dinâmica Molecular ou técnicas de minimização para buscar o espaço conformacional de uma molécula para conformações de baixa energia. Quando um potencial principal apropriado pode ser derivado, descrevendo o efeito das moléculas do solvente sobre a molécula do soluto, este último pode ser simulado por dinâmica estocástica. A aplicação da dinâmica estocástica permite variar a força de acoplamento dos átomos (através dos coeficientes de fricção γ) em banho térmico. Disto resulta a possibilidade de se estudar processos de transferência de energia através da molécula.⁹³

6.3 O Campo de Força OPLS

Campos e força descrevem interações interatômicas e a mecânica das deformações moleculares. O campo de força OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulation*) foi desenvolvido para simulação de líquidos orgânicos no final da década de 1980. As funções potenciais deste campo de força têm uma forma simples e foram parametrizadas diretamente para reproduzir dados termodinâmicos e estruturais em fluidos. Consequentemente, estas funções potenciais são computacionalmente eficientes e a descrição de proteínas em solução ou cristalinas é superior à de outras alternativas.⁹⁴

Proteínas possuem subunidades orgânicas facilmente identificáveis, tais como amidas, hidrocarbonetos, alcoóis, tio-éteres, etc. Desta forma, o campo de força OPLS foi parametrizado considerando-se uma boa descrição de líquidos orgânicos. Para de interações

não covalentes inter e intramoleculares, o campo de força OPLS adota os termos de Coulomb e Lennard-Jones interagindo entre sítios centrados em um núcleo (Equação 40).

$$\Delta E_{ab} = \sum_i^{em_a} \sum_j^{em_b} q_i q_{je}^2 / r_{ij} + A_{ij} / r_{ij}^{12} - C_{ij} / r_{ij}^6 \quad \text{Eq. 40}$$

Assim, a energia de interação intermolecular entre moléculas *a* e *b* é dada pela soma das interações entre os sítios das duas moléculas. A contribuição não covalente para a energia intramolecular é avaliada com a mesma expressão para todos os pares de sítios separados por mais de três ligações.

O principal problema da maioria dos campos de força usados em simulação de proteínas é a forma funcional da energia potencial. Esta forma tem restrições importantes como o uso de cargas centradas em átomos (em oposição a uma descrição mais precisa de uma distribuição de carga molecular) e a falha em tratar polarização eletrônica explicitamente. Embora as interações não covalentes (termos de carga-carga e de Van der Walls) possam ser obtidos por cálculos do estado líquido, parâmetros como os termos de estiramento, deformação e torsão são obtidos por cálculos de química quântica. Com o avanço nos métodos quânticos, os parâmetros do OPLS foram atualizados no início da década de 2000. É importante destacar que, entre as modificações introduzidas, a descrição das cargas e dipeptídeos carregados, tais como ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina e histidina protonada foram realizadas por meio do cálculo em nível HF/6-31G**. As últimas atualizações incorporaram ainda parâmetros para outros elementos químicos, incluindo o boro e o zinco, os quais serão alvos de estudos neste trabalho.⁹⁵

Para as metalo-enzimas (tais como a histona deacetilase, objeto de estudo deste trabalho) a descrição do complexo metal-ligante é muito problemática devido à transferência de carga variável do íon metálico ao seu ligante. Na descrição das cargas destas espécies químicas, o modelo “não-ligado” (amplamente utilizado na descrição do zinco) torna o sítio metálico muito sensível ao campo eletrostático produzido pelas cargas parciais das espécies químicas vizinhas dentro da proteína.⁹⁶

Neste trabalho, será necessária a avaliação da interação entre o elemento químico boro e o íon de zinco. Há poucos campos de força com parâmetros para estes dois

elementos. Utilizamos o campo OPLS-2005. Entretanto, há limitações no uso deste campo de força. Por exemplo, a descrição das densidades de cargas parciais do grupo boronato neste campo de força é fixa em certos valores independente do ligante químico o que causa uma imprecisão nos cálculos uma vez que esta distribuição de cargas pode ser bastante afetada pelo ligante (quando este grupo está associado a um ligante rico em densidade eletrônica como alcenos e anéis aromáticos, por exemplo).

6.4 Validação do Método (critérios de convergência)

Em simulações envolvendo dinâmicas moleculares é importante definir se as estruturas estudadas atingiram o estado de equilíbrio (a “convergência”). É, entretanto, muito difícil comprovar que este equilíbrio foi atingido. O tempo total de simulação é um fator de grande importância nas dinâmicas moleculares sendo que em biomoléculas (proteínas, DNA, etc.) um tempo pequeno (inferior a 100 nanossegundos) pode não produzir a convergência nos cálculos. Geometrias de partida distintas podem gerar resultados distintos indicando que não atingiram o estado de equilíbrio. É notável, entretanto, que, em alguns casos, algumas propriedades (tais como potencial eletrostático) podem convergir mesmo em resultados diferentes (que não “convergiram”) oriundos de geometrias distintas.⁹⁷

Os critérios para definir se há convergência em cálculos de dinâmica moleculares não são consensuais e há uma discussão ampla sobre a forma mais adequada de se estabelecer tais critérios. Alguns critérios possíveis são o cálculo do RMS, a busca conformacional das geometrias mais favorecidas, a variação de energia total com a temperatura. A relação entre a variação de energia total e o tempo tendem a ser reduzidas com a convergência e este é um dos critérios possíveis para a avaliação da convergência. Embora seja muito utilizado, o RMSD (“*Root Mean Square Deviation*”) pode não demonstrar de forma segura que o sistema atingiu o estado de equilíbrio. Estudos recentes demonstraram que o RMSD pode falhar na avaliação da convergência.⁹⁸ Neste trabalho, usamos alguns dos critérios citados como critério de convergência o uso de diferentes geometrias de partida para as mesmas estruturas e a avaliação da relação energia total/tempo e simulação. Os cálculos de dinâmica molecular são precedidos por cálculos de minimizações de energia, isto é, de busca pela geometria de menor energia (a otimização de geometria). Demonstramos as convergências

nestes cálculos com apresentação dos gráficos da relação entre a energia total e o número de iterações (ou seja, do número de ciclos nos cálculos).

6.5 Modelo de Solvente

6.5.1 Mecânica Molecular

Nos cálculos de mecânica molecular desenvolvidos neste trabalho, o modelo de solvente adotado foi o modelo de solvatação contínuo GB/SA. Neste modelo, a energia livre de solvatação consiste de um termo cavidade solvente-solvente (G_{cav}), um termo de Van der Walls soluto-solvente (G_{vdW}) e um termo de polarização eletrostática (G_{pol})(Equação 11).

$$G_{sol} = G_{cav} + G_{vdW} + G_{pol} \quad \text{Eq. 41}$$

Para hidrocarbonetos saturados em água, G_{sol} está linearmente relacionado a uma área superficial acessível ao solvente (SA)

$$G_{sol} + G_{cav} = \sum \sigma_k SA_k \quad \text{Eq. 42}$$

Onde $S.A._k$ é a área superficial total acessível ao solvente de átomo do tipo k e σ_k é um parâmetro empírico de solvatação atômica. Usa-se $7,0 \text{ cal}/(\text{mol} \cdot \text{Å}^2)$ como valor de σ_k para todos os tipos de átomos para reproduzir a energia de hidratação de um hidrocarboneto simples.

Para G_{pol} , a energia livre eletrostática total (G_{es} Kcal/mol) de um sistema de partículas amplamente separadas (separação r (Å), cargas q (elétrons), raio α (Å)) em um meio de constante dielétrica ϵ é dado pela soma da Lei de Coulomb em um dielétrico (termo 1 da Equação 13) com a equação de Born (termo 2 da Equação 13)

$$G_{es} = 332 \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{i=i+1}^n \frac{q_i q_j}{r_{ij} \epsilon} - 166 \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \sum_i^n \frac{q_i^2}{\alpha_i} \quad \text{Eq. 43}$$

O termo 1 pode ser expandido algebricamente (Equação 14) para dar a lei de Coulomb no vácuo e um novo segundo termo o qual é calculado pelo efeito de um meio dielétrico sobre as interações de partículas carregadas.

$$G_{es} = 332 \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{i=i+1}^n \frac{q_i q_j}{r_{ij} \epsilon} - 332 \sum_{j=1}^{n-1} \sum_{i=i+1}^n \frac{q_i q_j}{r_{ij} \epsilon} - 166 \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \sum_i^n \frac{q_i^2}{\alpha_i} \quad \text{Eq. 44}$$

$$G_{es} = -166 \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=1}^n \frac{q_i q_j}{f_{GB}} \quad \text{Eq.45}$$

As formas similares dos termos 2 e 3 na Equação 14 permite combiná-los em uma expressão única (Equação 15) onde se define a função f_{GB} como uma função de r_{ij} e α_{ij} . Esta função não está definida de uma única forma, mas uma forma simples e efetiva de defini-la é $f_{GB} = (r_{ij}^2 + \alpha_{ij}^2 e^{-D})^{0,5}$ onde $\alpha_{ij} = (\alpha_i \alpha_j)^{0,5}$ e $D = r_{ij}^2 / (2\alpha_{ij})^2$. Usado na equação 15, esta expressão produz a equação de Born para cargas sobrepostas quando $r_{ij} = 0$.

6.5.2 Cálculo ab initio

A modelagem computacional de solventes baseia-se em duas metodologias básicas: a descrição do solvente com as moléculas deste representadas de forma explícita (como entidades a serem calculadas em conjunto com o soluto) e a descrição como um modelo de solvatação contínua. Este último tem sido amplamente utilizado tanto em cálculos de mecânica molecular como em cálculos **ab initio**. Esta forma de modelagem apresenta uma vantagem de não necessitar da configuração média das moléculas de solvente visto que se considera como ponto de partida as propriedades macroscópicas que caracterizam o solvente. Além disto, este modelo permite estimar com razoável exatidão as forças

eletrostáticas de longa distância e podem incluir efeitos de polarização que são frequentemente negligenciados em modelos com moléculas de solventes explícita.

Um dos modelos mais utilizados é o modelo do contínuo polarizável (Polarizable Continuum Model - PCM). O modelo PCM utiliza a densidade de carga superficial aparente para descrever a polarização de um dielétrico contínuo. Esta densidade é posta sobre a superfície da interface solvente-soluto. Uma equação integral é formulada a partir das propriedades eletrostáticas da densidade de carga do soluto na superfície. Quando o método usado para descrever a densidade de carga do soluto na superfície permite a polarização deste, o método PCM é capaz de estimar a polarização mútua solvente-soluto.¹⁰¹

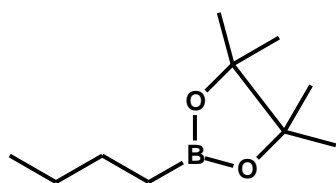
Este trabalho aborda quatro tópicos gerais sobre a atividade tripanocida de alguns compostos. Para tornar a apresentação das metodologias e resultados mais didática, optamos por dividi-la em quatro partes distintas respeitando as especificidades de cada um dos temas estudados.¹⁰¹ Na primeira parte, vamos trabalhar na avaliação da atividade tripanocida dos ácidos borônicos de cadeia curta. Para isso, foram realizados testes *in vitro* bem como simulações computacionais para identificação dos prováveis mecanismos. Os resultados são apresentados e discutidos quanto a sua relevância em relação aos mecanismos metabólitos do *T. cruzi*. Na segunda parte, serão apresentados os resultados de simulação do mecanismo de ação inibitória dos ácidos carboxílicos de cadeia curta sobre a HDAC. Os resultados são apresentados juntamente com a hipótese da existência da participação de um sítio vicinal no mecanismo de atividade destes compostos. Na terceira parte, são apresentados os resultados dos ensaios *in vitro* dos medicamentos híbridos e das combinações de medicamentos sobre células de *T. cruzi* nas formas epimastigota e amastigota intracelular. Na quarta parte são apresentados os estudos *in silico* de ácidos hidroxâmicos de cadeia curta e a síntese dos mesmos. Na última parte, os estudos sobre a nevirapina são demonstrados. Este medicamento antirretroviral foi avaliado quanto a sua atividade tripanocida e quanto aos possíveis análogos capazes de possuir atividade contra as formas resistentes do HIV-1. O estudo de atividade tripanocida foi experimental enquanto as avaliações dos análogos foram realizadas por simulação.

Capítulo 7

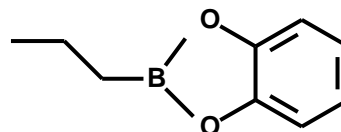
Avaliação da atividade tripanocida dos ácidos borônicos de cadeia curta

7.1 Metodologia de Avaliação da Atividade Tripanocida (ensaios *in vitro*)

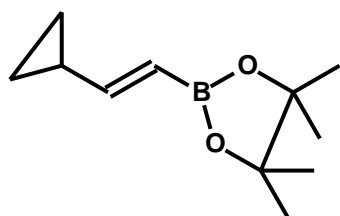
O ácido butírico foi utilizado como composto de referência para os estudos (tanto teóricos quanto experimentais) por possuir uma atividade inibitória sobre a HDAC bem descrita. Foram avaliados quatro ésteres de ácidos borônicos de cadeia curta (Figura 19) análogos do ácido butírico. Todos os compostos testados foram obtidos da Aldrich, nível de pureza P.A. A escolha dos ésteres borônicos deve-se a sua estabilidade (são líquidos à temperatura ambiente, podem ser estocados sob refrigeração por períodos prolongados) e sua boa lipossolubilidade o que garante uma boa biodisponibilidade.



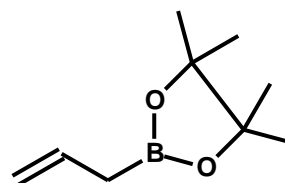
Éster pinacol do ácido butilborônico



Éster catecol do ácido propilborônico



Éster pinacol do ácido
trans-(2)-ciclopropilvinilborônico



Éster pinacol do ácido alilborônico

Figura 19 Ésteres borônicos testados quanto a sua atividade tripanocida

7.1.2 Ensaio MTT

Para o ensaio da atividade tripanocida de cada um dos ésteres borônicos investigados, as células foram incubadas em meios cujas concentrações de éster borônico variam de 0,5 μM a 20 μM . Cada éster borônico foi dissolvido em Dimetil-Sulfóxido e a concentração final de DMSO ficou abaixo de 1%.

A viabilidade celular foi então avaliada pela adição do corante MTT (500 $\mu\text{g/mL}$). Quatro horas depois do período de incubação, o meio contendo MTT foi removido. Os cristais de formazan foram dissolvidos em 100 μL /poço de dimetil-sulfóxido (DMSO). A placa foi lida em um espectrômetro Bio-Rad Bench marca Microplate Reader no comprimento de onda 570 nm. As amostras de todas as concentrações foram avaliadas em triplicata.

7.1.3 *Trypanosoma cruzi*

Em todo trabalho experimental foram utilizadas as formas epimastigotas da cepa CL Brener (ZINGALES et al., 1997; CANO et al., 1995) e tripomastigotas e amastigotas da cepa Y (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953).

7.1.4 Células L6

As células L6 utilizadas são do tipo mioblasto e foram originalmente isolados por YAFFE (1968), de culturas primárias de músculo de rato (*Rattus norvegicus*).

7.1.5. Manutenção das culturas

Trypanosoma cruzi

As células epimastigotas foram mantidas em cultura de 8 mL de meio LIT (Liver Infusion Tryptose) a uma temperatura de 28°C. A manutenção da cultura foi feita com

repiques em intervalos de uma semana, utilizando 20% do inóculo. As culturas de tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* foram mantidas em cultura de células L6, e foram recolhidos diariamente, centrifugados e congelados em soro fetal bovino contendo 10% de DMSO a -80°C em nitrogênio líquido.

7.1.6. Células L6

As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos a 37°C com 5% de CO₂. A manutenção foi realizada com repiques semanais, como descrito a seguir: o meio DMEM suplementado utilizado para a multiplicação foi retirado e descartado, 2 mL de solução de verseno contendo 1 % de tripsina foram adicionados às garrafas e as células foram mantidas nesta solução à temperatura ambiente por aproximadamente 30 s. Após este período, a solução de verseno foi retirada e descartada e as células incubadas a 37°C por 10 min para que descolassem da garrafas. Em seguida, 2 mL de meio DMEM suplementado foram adicionados em cada cultura para homogeneização das células e 500 µL de suspensão de células foram inoculadas em garrafas de 25 cm² (Corning) contendo 5 mL de meio DMEM suplementado. As células foram incubadas a 37°C evitando-se que as mesmas entrassem em confluência, realizando-se repiques periódicos. O meio das células L6 foi trocado a cada dois dias para evitar que houvesse a diferenciação destas células.

7.2 Infecção com *T. cruzi* das monocamadas de células L6 para ensaios de Imunofluorescência

7.2.1 Em lamínulas

As monocamadas de células L6 foram obtidas em lamínulas de aproximadamente 2 cm² por meio do plaqueamento de 4 x 10⁴ células/ cm² em placas de 24 orifícios contendo 500 uL de meio DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino. Após 48 h de incubação em estufa a 37°C e a 4% de CO₂ foi obtido aproximadamente 8 x 10⁴ células/ cm². Nesta densidade, as células foram expostas à suspensão de parasitos (células

tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* cepa Y) na proporção de aproximadamente 10 parasitos para cada célula hospedeira. As infecções foram mantidas na placa por 24 h. Após este período, o meio de cultura foi retirado de cada orifício e adicionou-se nevirapina nas diversas concentrações em 500 µL de meio DMEM. Em um dos orifícios da placa, o tratamento com a nevirapina foi simultâneo à infecção, e as células permaneceram incubadas por 48 h.

Para a montagem das lâminas, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS 1 X, a fim de eliminar os parasitos extracelulares. Em seguida as células foram fixadas por 20 min com 4% de paraformaldeído em PBS 1X. Após as lâminas secarem, foram adicionados 5 µL de *Prolong Gold* (Invitrogen) contendo DAPI. As lamínulas foram depositadas sob a lâmina que foram, logo em seguida, incubadas no escuro por um período de 36 h à temperatura ambiente.

As lâminas foram então analisadas em Microscopia Confocal de Imunofluorescência (*Leica Microsystems Model TCS SP5*).

7.2.2 Microscopia Eletrônica

Depois de tratadas com soluções de concentrações igual a 5 mol/L, as formas epimastigotas foram lavadas em 0,01 M de solução-tampão salina de fosfato e fixadas com 2,5% glutaraldeído em solução tampão 0,1 M cacodilato. As células foram pós-fixadas em uma solução contendo 1% de ferrocianeto em 0,1 M de tampão cacodilato, lavadas com a mesma solução-tampão, desidratada em diferentes concentrações de acetona e colocadas em resina Epon. Seções delgadas foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas com um microscópio de transmissão eletrônica. (Laboratório de Microscopia Eletrônica, Instituto de Biologia, UnB).

7.5 Resultados dos Ensaio *In Vitro*

7.5.1 Atividade tripanocida

Os ésteres de pinacol ciclopropilborônico, alilborônico e butilborônico não demonstraram atividade detectável sobre as células do *T. cruzi*. O único éster a demonstrar atividade contra *Trypanosoma cruzi* foi o éster catecol butilborônico. Este éster demonstrou citotoxicidade sobre células de *T. cruzi* na concentração de 5 μ M. Observou-se, por microscopia óptica, que a célula do protozário torna-se esférica e morre quando submetido ao meio enriquecido com o éster o éster catecol do ácido propilborônico. Uma vez que o catecol possui uma citotoxicidade já descrita na literatura,¹⁰³ inclusive contra *Trypanosoma cruzi*¹⁰⁴ avaliamos também sua atividade de forma comparativa com a do éster catecol borônico que apresentou atividade.

7.5.2. Microscopia eletrônica

Os resultados da microscopia eletrônica são apresentados na Figura 20. Os dados de Microscopia Eletrônica evidenciam alguns aspectos estruturais típicos de apoptose. Como pode ser observado na Figura 20, o mitocondrion de *T. cruzi* na presença do éster borônico mostra-se “esvaziado”, característica típica no processo de apoptose.

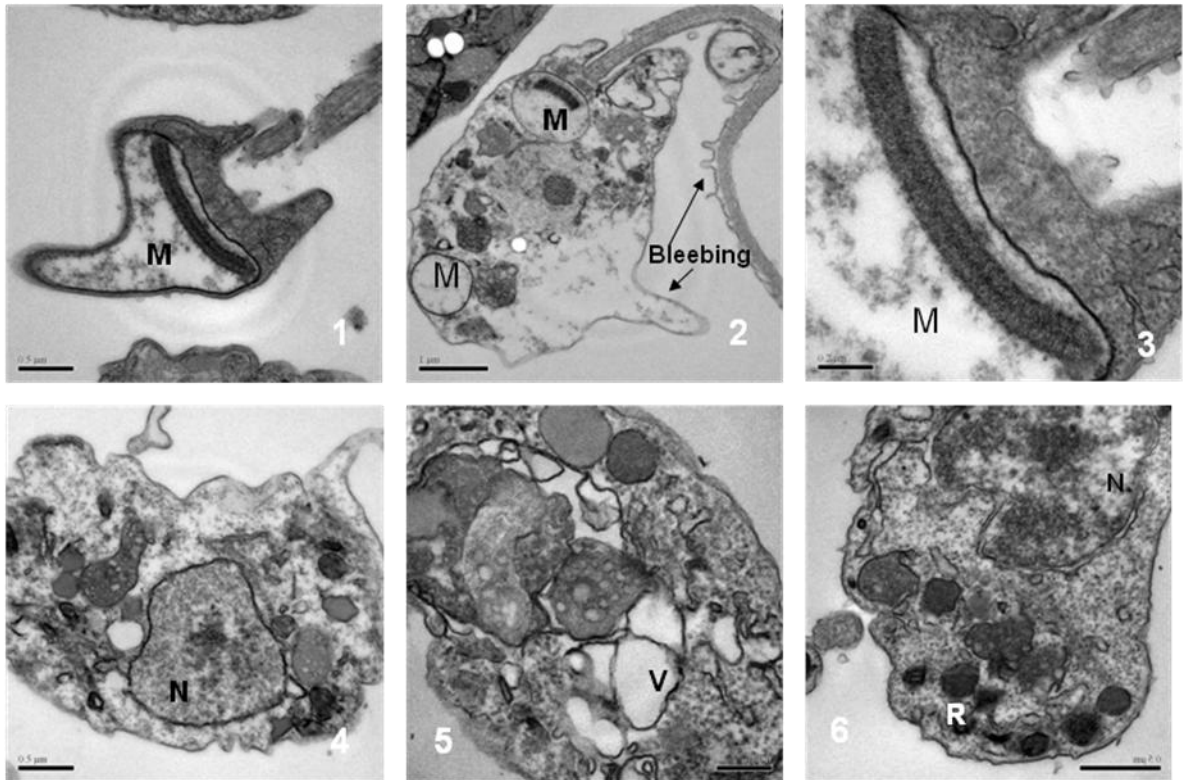


Figura 20 Algumas características típicas de apoptose observadas no *T. cruzi* na presença do éster borônico. Em (1); observa-se o “esvaziamento” do mitocôndrio. Em (2) pode-se observar o “*membrane blebbing*” da membrana plasmática, inclusive no flagelo da célula do *T. cruzi*. O núcleo, o vacúolo e os reservossomos são apresentados, respectivamente, nas imagens (4), (5) e (6)

Outras características de apoptose importantes, tais como o “*membrane blebbing*” e o aumento no número de vacúolos são observados também. Entretanto, ainda não é possível afirmar que se observou a apoptose do *T. cruzi*. Uma observação importante foi realizada neste experimento: o *membrane blebbing* (a desestruturação da membrana plasmática) do flagelo celular (Figura 20). Este resultado, aparentemente ainda não foi descrito na literatura. Em conjunto, estes resultados sugerem que o éster catecol propilborônico induz a apoptose celular do *T. cruzi*.

7.6 Ensaio de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade não demonstrou toxicidade relevante dos ésteres borônicos sobre as células L6 (células cardíacas de camundongos) nas concentrações avaliadas (ver

Figuras 21 e 22). Neste teste, as células L6 foram replicados *antes* da adição dos ésteres borônicos. O resultado indica, portanto, que não toxicidade apreciável sobre a célula hospedeira pode parte destes compostos.

Em um ensaio adicional (no qual o meio e o medicamento foram ministrados simultaneamente antes da incubação das células) um resultado importante foi observado: em concentrações acima de cerca de 20 μM , o éster *inibe o crescimento celular*. Isto poderia significar que o éster afeta a replicação celular visto que neste teste, a célula precisa replicar na presença do éster enquanto que no outro ensaio de citotoxicidade a célula já havia se replicado. Testes adicionais são necessários, entretanto, para avaliar esta hipótese porque o éster poderia ter afetado outros parâmetros (como a adesão da célula na placa).

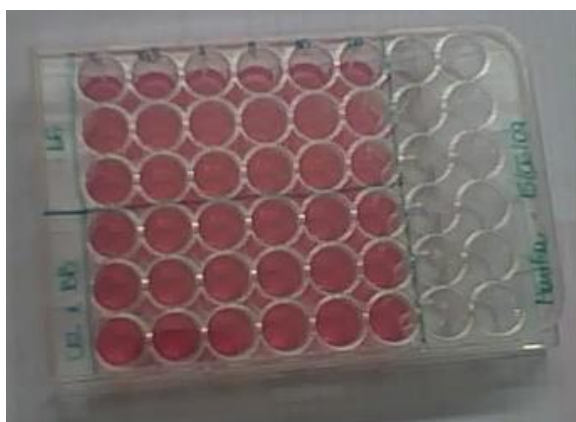


Figura 21 Placas com cultura de células cardíacas de camundongos



Figura 22 Placa com cultura e corante para a espectroscopia

Os testes de citotoxicidade dos ésteres borônicos de cadeia curta sobre o *T. cruzi* revelaram que apenas o éster catecol propilborônico apresenta atividade sobre as células do protozoário. Por possui o álcool biologicamente ativo (catecol), acrescentamos também um teste com este álcool para avaliar comparativamente a atividade do mesmo. Este resultado pode ser observado no gráfico abaixo (Figura 23), o qual corresponde à leitura de absorbância de alguns dos ésteres testados comparados à atividade do catecol.

Absorbância

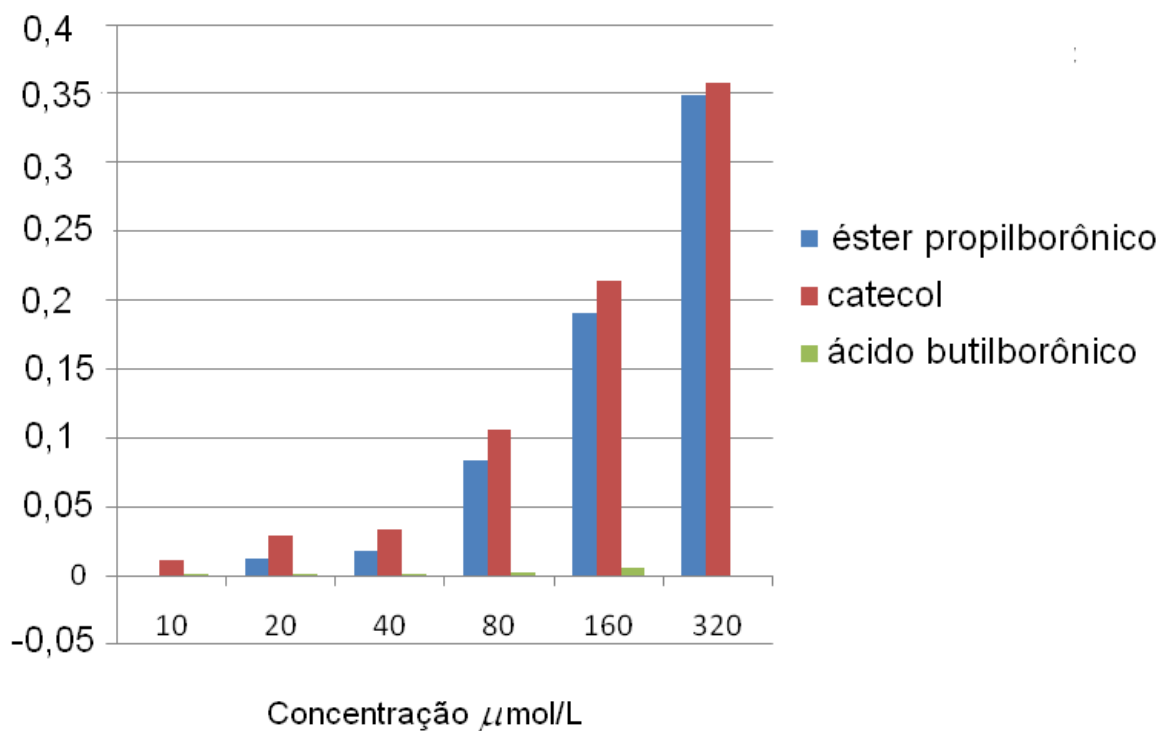


Figura 23 Absorbância versus concentração dos ésteres borônicos. Não se identificou atividade significativa dos ésteres borônicos e exceto no caso do éster catecol propilborônico o qual apresentou um desvio na leitura da absorbância.

No gráfico, é possível observar uma equivalência de atividade tripanocida entre o éster catecol propilborônico e o álcool catecol. É possível observar que a atividade do catecol é comparável à atividade do éster catecol propilborônico o que sugere que a atividade deste éster se deve ao álcool e não ao ácido borônico. Há um desvio na leitura: a absorbância das amostras ocorre em maior quantidade no comprimento de onda da amostra referência (“a leitura zero”).

7.7 O desvio no ensaio MTT e o composto borônico ativo.

O ensaio MTT se baseia, essencialmente, na capacidade de redução da molécula do corante (3-(4,5dimethylthiazol-2yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) (“MTT”) por células vivas (devido à moléculas oriundas do processo respiratório celular, tais como o NADH e

FADH as quais são capazes de reduzir a molécula do MTT)(Figura 24). O catecol também tem a capacidade de reduzir o corante MTT inviabilizando a quantificação de sua atividade por este método ocasionando um falso negativo e um desvio na curva de atividade, isto é, uma absorbância maior do que a das amostras sem drogas testadas (a leitura do “zero”).¹¹⁰

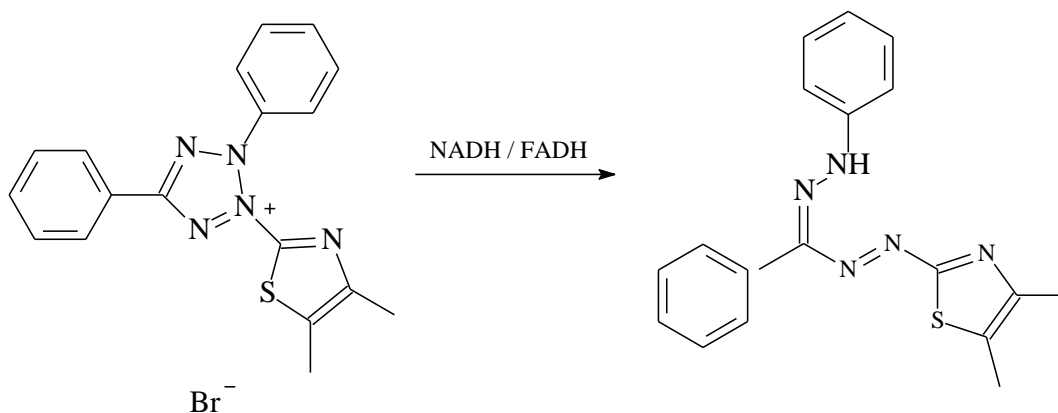


Figura 24 Reação de redução do corante MTT

Para avaliar a citotoxicidade do éster catecol propilborônico, utilizou-se o ensaio de exclusão Trypan Blue (o qual independe da capacidade redutora da molécula). Este ensaio baseia-se na permeabilidade da membrana plasmática. Em células mortas o corante Trypan Blue consegue atravessar a membrana e colorir a célula, ao contrário de células vivas as quais são impermeáveis a este composto. A contagem é feita por exclusão das células coradas (células morta) sendo, portanto, este teste chamado de ensaio de exclusão *Trypan Blue*. Os resultados demonstram a citotoxicidade do composto e sua capacidade em reduzir o crescimento celular (Figura 25). Possivelmente, a atividade observada sobre o *T. cruzi* derivou do catecol associado ao ácido borônico no éster catecol propilborônico. De fato, a absorbância do catecol no ensaio MTT e a citotoxicidade avaliada por meio do teste Trypan blue revelam que o catecol isoladamente tem um comportamento similar ao do éster borônico em relação a citotoxicidade. Devido à elevada citotoxicidade do catecol, seria inviável aplicar o éster catecol propilborônico como medicamento para combate à infecção por *T. cruzi*.

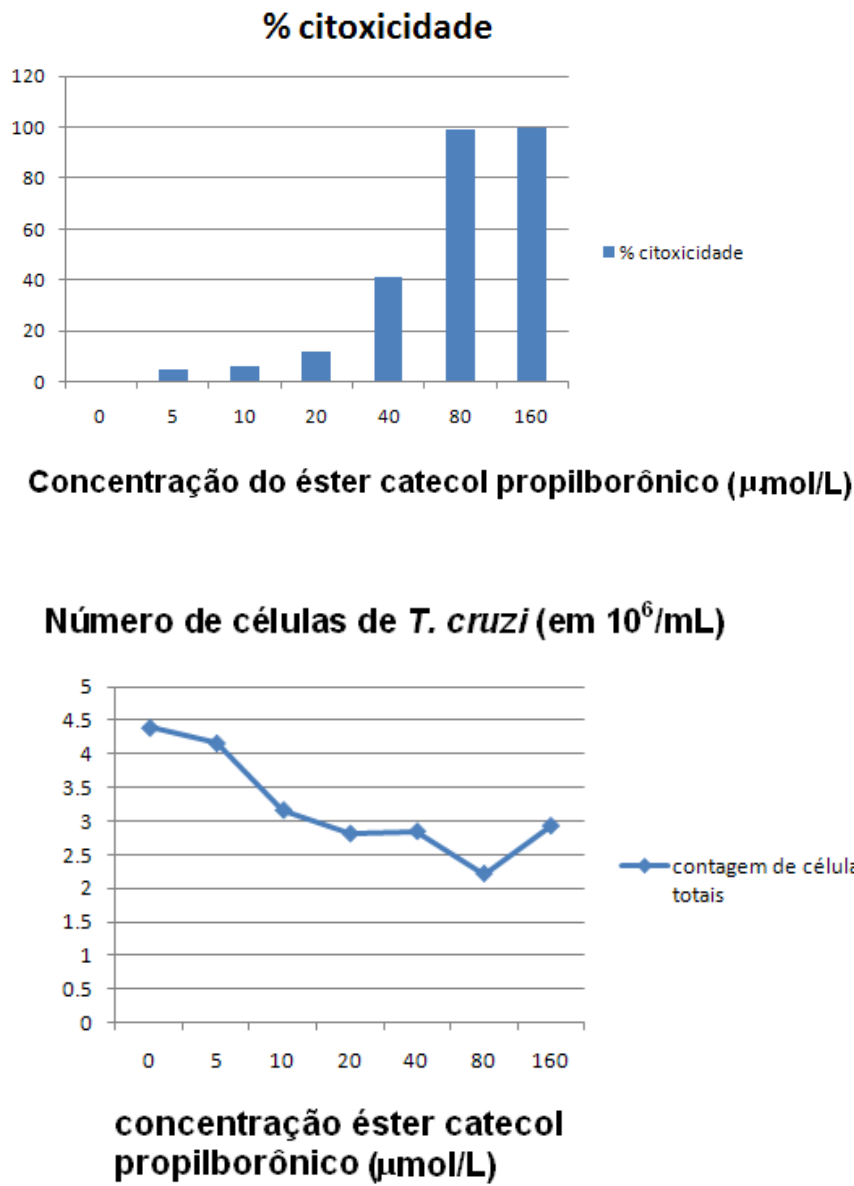


Figura 25 Citotoxicidade e número de células viáveis na cultura tratada com éster catecol propilborônico.

Os testes em células L6 infectadas com *T. cruzi* revelaram, da mesma maneira, inatividade dos ésteres borônicos sobre o *T. cruzi* intracelular. Nas imagens da microscopia abaixo, é possível perceber que o nível de infecção pelo *T. cruzi* é semelhante nas amostras com e sem os compostos (Figura 26) o que demonstra a inatividade destes compostos sobre as células do *T. cruzi*. Neste teste, a forma intracelular (amastigota) do *T. cruzi* comporta-se de forma similar à forma epimastigota não apresentando citotoxicidade significativa aos compostos avaliados.

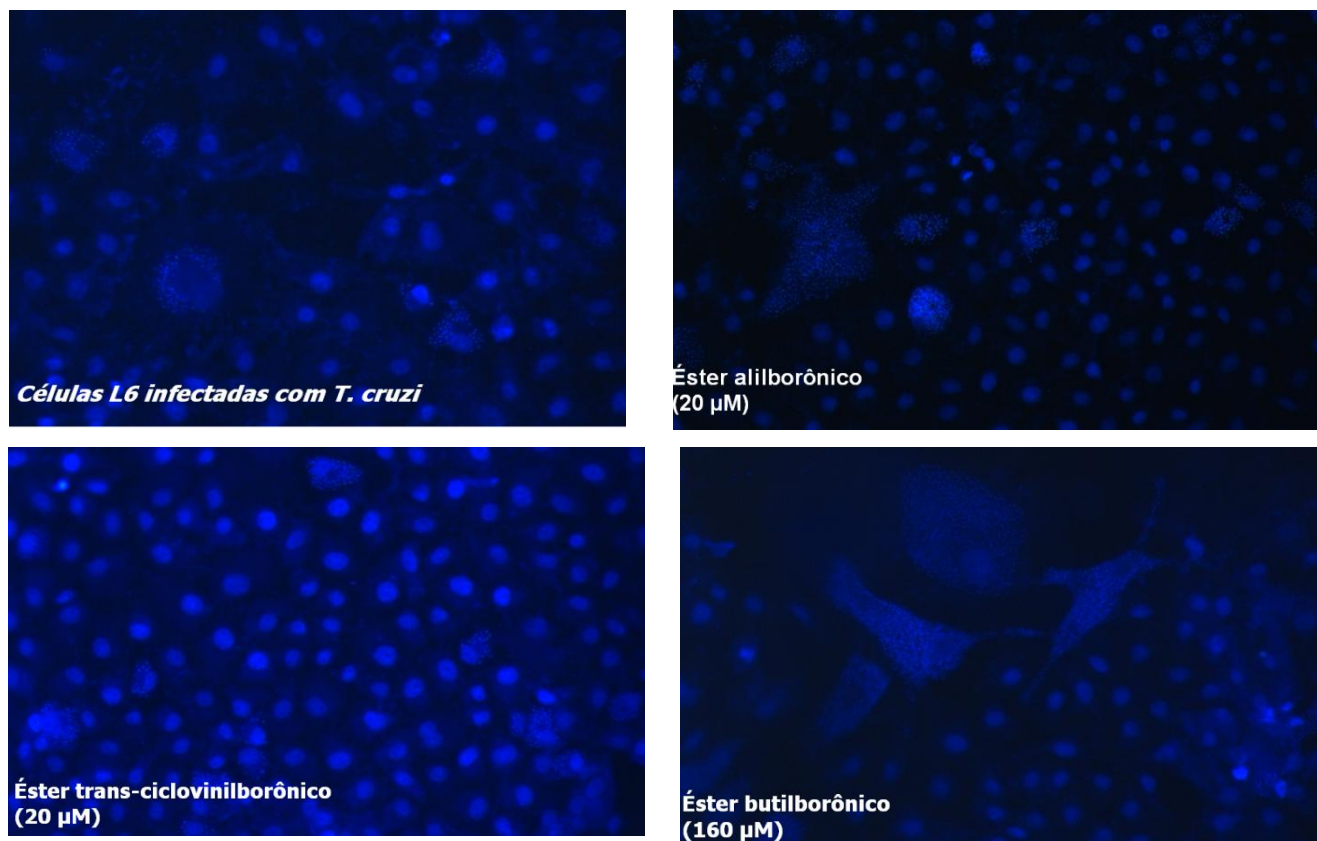


Figura 26 Imagens da microscopia de fluorescência. Os pontos brilhantes dentro das células indicam a presença do parasita.

As imagens de microscopia por imunofluorescência também revelam que tanto o catecol quanto o éster catecol propilborônico comportam-se da mesma forma sugerindo que a atividade deste éster deriva do álcool (Figura 27).

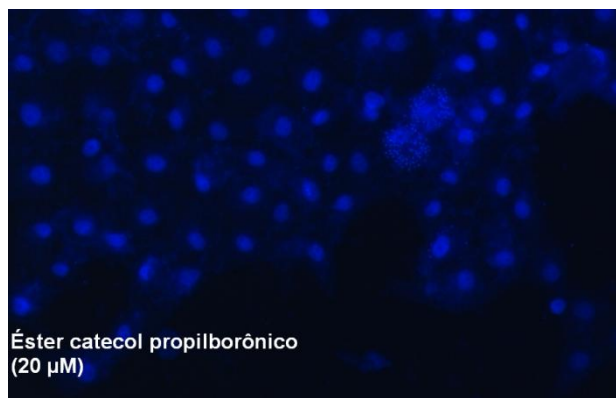
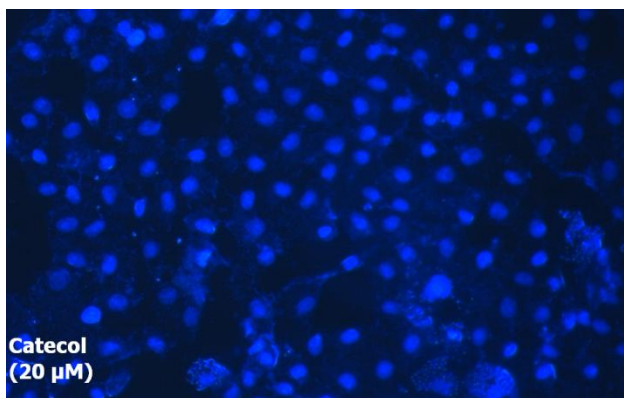


Figura 27 Imagens da microscopia de fluorescência. A comparação mostra uma atividade similar entre o catecol e o éster catecol propilborônico.

As imagens das células infectadas mostram a citotoxicidade com a morfologia celular alterada e a densidade celular também reduzida. Estes resultados sugerem que a hidrólise do éster borônico com a consequente oxidação do catecol e a liberação de produtos tóxicos sejam a causa da atividade observada neste éster borônico. Aparentemente, portanto, a presença do ácido borônico associado à molécula do álcool catecol não afeta a atividade tripanocida deste composto.

Capítulo 8

Metodologia da Simulação Computacional

Nesta seção, detalhamos a metodologia adotada na simulação dos sistemas estudados.

8.1 Mecânica Molecular

Preparação da Estrutura da Enzima.

- O arquivo adotado para as simulações foi o 1T67 do P.D.B., o qual corresponde à estrutura de uma histona deacetilase complexada com um inibidor MS-344 (um ácido hidroxâmico).

- A estrutura cristalográfica foi pré-tratada com a ferramenta *Protein Preparation Wizard*, do software **MAESTRO 9.1**. Esta ferramenta executa algumas modificações no arquivo, entre elas: a substituição de ligações covalente com o metal por ligações de ordem zero, adição de átomos de hidrogênios na estrutura e a correção de cadeia laterais de aminoácidos com átomos de carbono ausentes (tendo, portanto, valências incompletas).

Escolha da Geometria de Partida

- O passo seguinte foi o posicionamento do inibidor em estudo na cavidade investigada. Para cada molécula adotou-se um procedimento específico.

- *Na simulação dos ácidos hidroxâmicos*, a geometria de partida adotada foi a mesma daquela do inibidor MS-344 (presente na estrutura cristalografia do arquivo MS-344). O grupo funcional hidroxamato foi mantido na mesma geometria encontrada na estrutura e apenas a cadeia lateral foi alterada. Os hidrogênios da cadeia lateral foram adicionados pro meio da ferramenta de construção de moléculas do MacroModel.

- Na simulação dos ácidos carboxílicos de cadeia curta, a geometria de partida também foi baseada na geometria do inibidor MS-344. Neste caso, o grupo funcional hidroxamato foi substituído pelo grupo funcional carboxilato com eliminação do átomo de oxigênio e a alteração do átomo de nitrogênio em um átomo de oxigênio negativamente carregado (Figura 28)

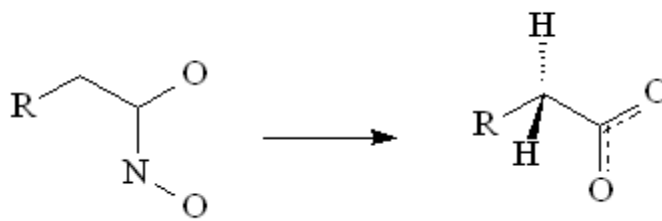


Figura 28 Determinação da geometria de partida dos ácidos carboxílicos a partir do ácido hidroxâmico.

- Na simulação dos ácidos borônicos de cadeia curta, a geometria de partida foi baseada na posição do inibidor MS-344. O grupo funcional hidroxamato foi convertido em boronato com a conversão do elemento químico carbono (presente no hidroxamato) em boro com as valências resultantes sendo preenchidas por três hidroxilas tendo o grupo a carga total igual a -1. (Figura 29). A cadeia lateral foi construída a partir da cadeia do inibidor MS-344 com a adição de átomos de hidrogênio por meio da ferramenta de adição do *software*.

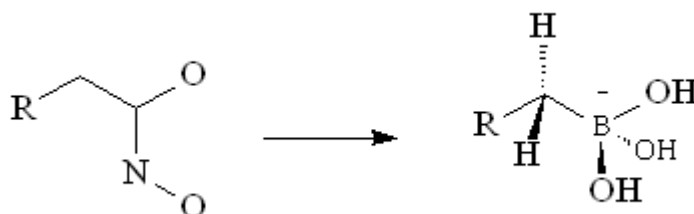


Figura 29 Determinação da geometria de partida dos ácidos carboxílicos a partir do ácido hidroxâmico.

- Na simulação dos ácidos carboxílicos de cadeia curta no sítio vicinal, a geometria de partida foi determinada manualmente. Adotou-se como referência o íon de sódio presente naquela cavidade. O ácido foi construído dentro do sítio a uma distância aproximadamente

igual àquela na qual grupo funcional hidroxamato se encontrava do zinco no sítio ativo (\cong 2,63 Å).(Figura 30).

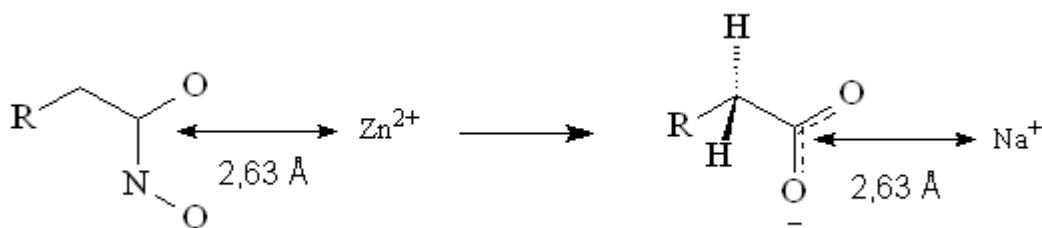


Figura 30 Escolha da geometria de partida dos ácidos carboxílicos de cadeia curta no sítio vicinal.

Para validar os resultados obtidos com o posicionamento manual do inibidor na cavidade vicinal, foram estudadas duas geometrias de partida que convergiam para a mesma geometria otimizada. É importante destacar que esta cavidade apresenta restrições espaciais que limitam o posicionamento dos inibidores. Assim, as duas geometrias de partida diferem uma da outra pela distância (a qual é maior na segunda geometria de partida em cerca de 1,0 Å).

Procedimento de cálculo.

A otimização de geometria e os valores de energia de interação foram calculadas com as estruturas construídas como o descrito anteriormente. O *software* utilizado foi o MacroModel 9.8. O cálculo adotado foi a dinâmica estocástica com o Campo de Força OPLS 2005 na temperatura de 300 K.

- Os valores de “cutoff” utilizados foram de 8 Å (para interações de Van der Waals) e 20 Å (para interações eletrostáticas). (Os valores de cutoff padrão do programa (7 Å para interações de Van der Waals e 12 Å para interações eletrostáticas) podem gerar resultados de menor qualidade para sistemas com espécies químicas carregadas, tais como as estudadas neste trabalho).

- As estruturas foram calculadas em solvente aquoso, com o modelo de solvatação contínuo GB/SA.

- O tempo de simulação foi de 10 nanossegundos, o tempo de equilíbrio 1.0 picossegundo e o tempo do passo (step time) de 1,5 picos. Este tempo foi suficiente para produzir a convergência, como demonstrado. Para validar os resultados, apresentamos alguns dos gráficos (energia total x tempo; energia cinética x tempo, energia potencial x tempo e temperatura x tempo) para demonstrar

- Os resultados da dinâmica estocástica foram obtidos na forma de valores médios de energia, isto é, a energia média das geometrias simuladas. (valores médios da energia eletrostática e valores médios da energia cinética).

Os cálculos de energia de interação foram realizados através da diferença de energia entre as estruturas otimizadas da enzima e do inibidor menos a energia do complexo enzima-inibidor

$$\text{Energia}_{\text{Interação}} = \text{complexo}_{\text{Enzima / inibidor}} - [\text{Enzima} + \text{inibidor}]$$

Equação 46 Fórmula usada no cálculo das interações entre a enzima e os inibidores

Para avaliação da convergência foram feitos cálculos a partir de diferentes geometrias de partida e avaliadas a relação entre a energia total e o tempo de simulação.

8.2 Método *ab initio*

- Preparação da estrutura

Nos cálculos **ab initio**, a geometria de partida adotada foi a geometria produzida pelos cálculos de dinâmica estocástica clássica (Figura 31). Foram mantidos nestes cálculos os aminoácidos ligados ao íon metálico (Zn^{2+}), ou seja, os aminoácidos aspartato e histidina.

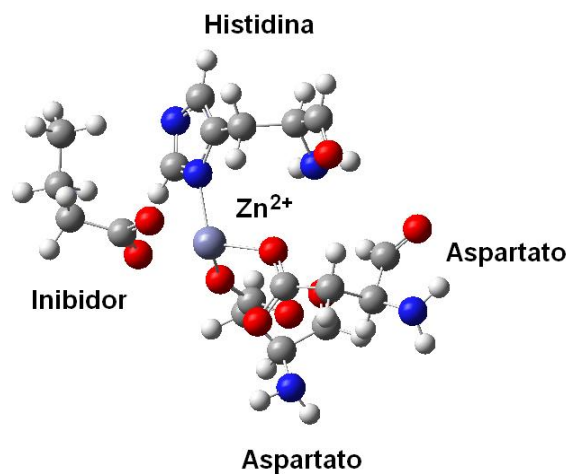


Figura 31 Geometria de partida adotada nas otimizações ab initio

- Otimização de geometria

A otimização de geometria foi realizada com método DFT 6-31+G* com o *software* Gaussian 09. Cargas foram obtidas a pelo método ChelpG. O modelo de solvente utilizado foi o modelo PCM.

Capítulo 9

Resultados da Simulação Computacional dos Ácidos Borônicos

Por ser uma molécula com uma elevada quantidade de aminoácidos carregados ou com momento de dipolo permanente, a histona deacetilase é bastante hidrofílica e possui uma quantidade relevante de ligações de hidrogênio. Isso faz com que interações eletrostáticas sejam bastante relevantes na estabilização da estrutura protéica e também favorece interação de grupos ionizados e/ou com momento de dipolo permanente capazes de interagir com os aminoácidos desta enzima.

O procedimento de dinâmica “estocástica” é precedido de uma minimização de energia. Na Figura 32, a relação entre energia e número de iterações para as simulações com os compostos borilados e carboxilatos é demonstrada. Em todos os casos, observa-se uma diminuição na variação da energia total após certo número de iterações o que sugere que uma convergência no valor desta energia.

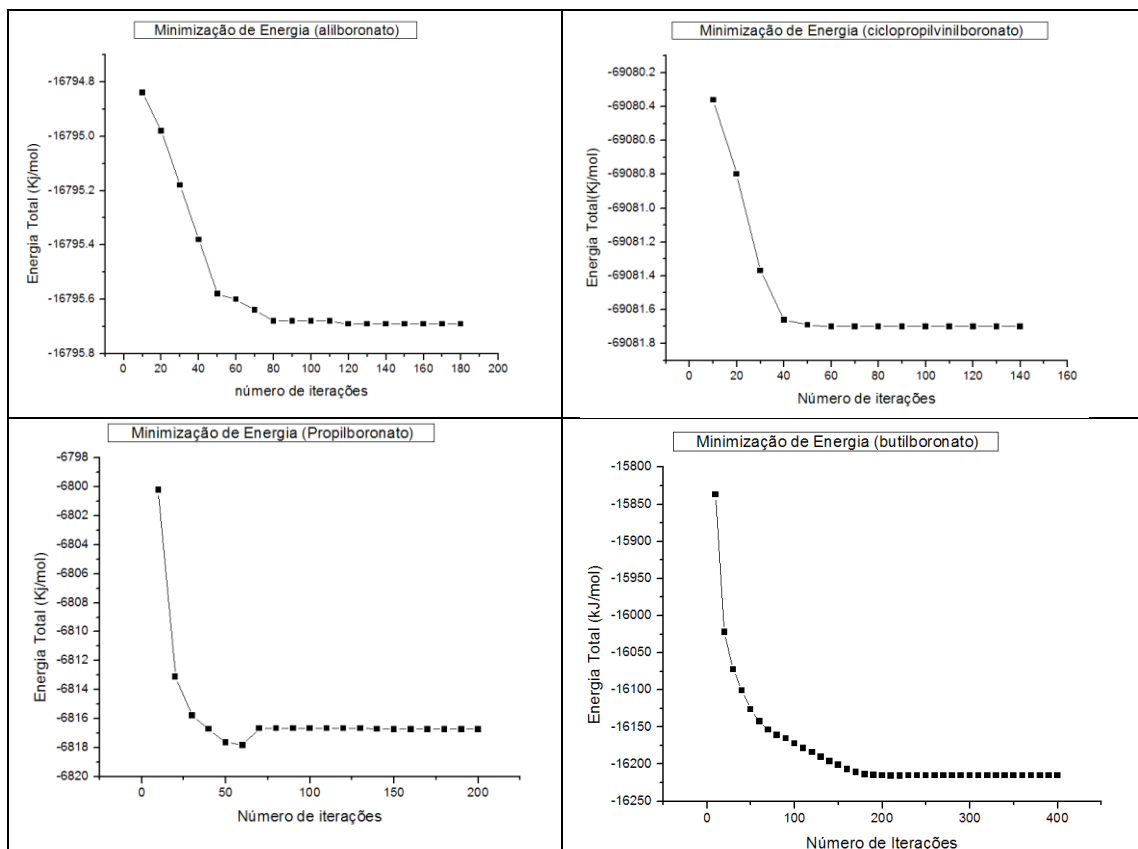


Figura 32 Gráficos da relação entre a Energia Total e o número de iterações para os ácidos carboxílicos de cadeia curta demonstrando a convergência das simulações.

Os resultados da dinâmica também apresentaram boa convergência. Na Figura 33, apresentamos os gráficos da relação entre as energias total, cinética e potencial com o tempo de simulação. Também apresentamos os gráficos da relação temperatura x tempo. Nestes gráficos, é possível observar uma redução na flutuação dos valores especialmente após cerca de cinco nanossegundos o que indica que este tempo de simulação é satisfatório para produzir uma boa convergência.

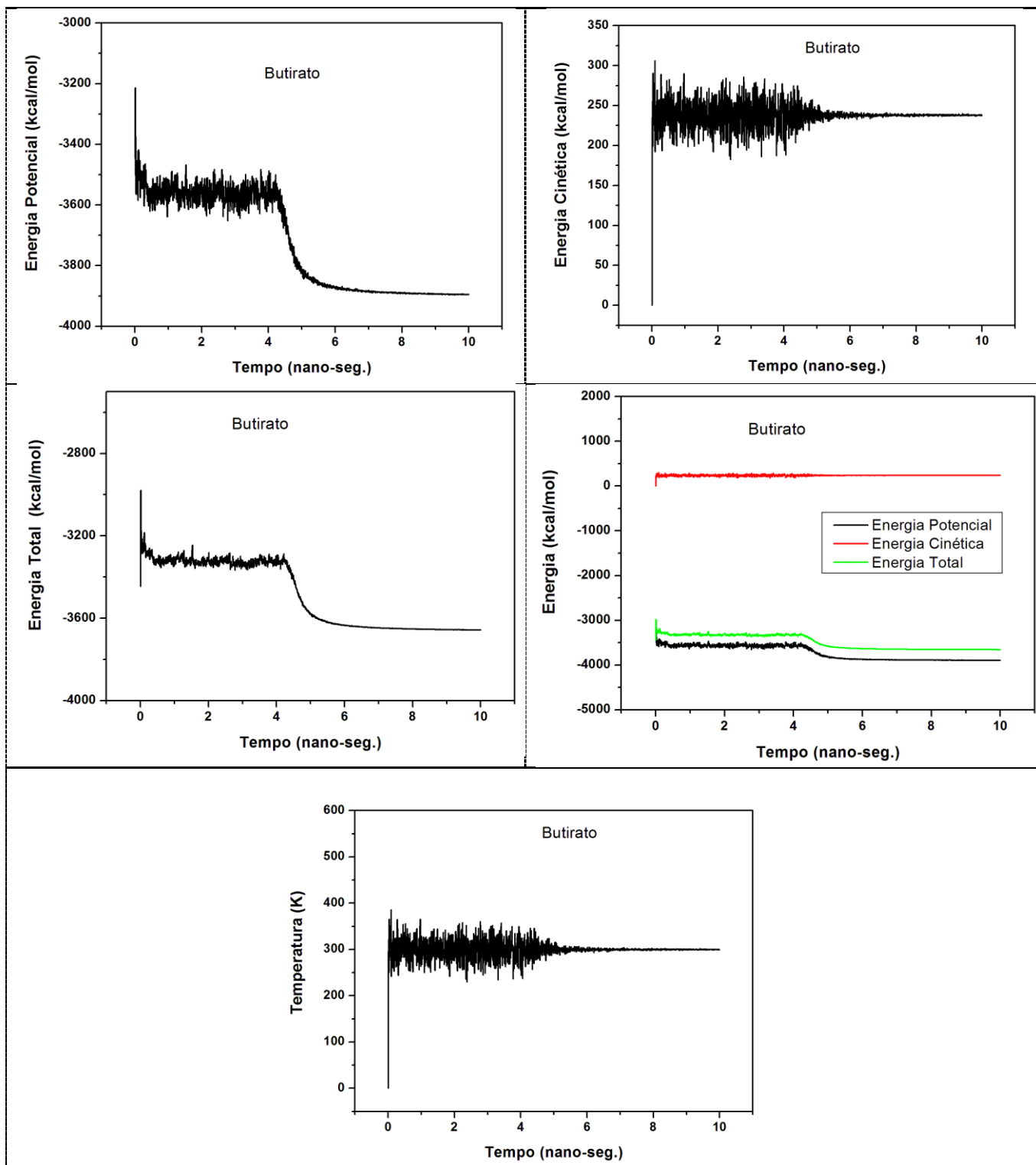


Figura 33. Gráficos demonstrando a relação energia cinética, potencial e total em relação ao tempo. Também é apresentado o gráfico da temperatura em relação ao tempo. Em todos os casos, os valores convergem após cinco nanossegundos.

Para o estudo da interação proteína-inibidor, avaliamos a energia de interação eletrostática entre ambas as espécies obtidas a partir da dinâmica molecular estocástica das espécies químicas envolvidas. Os resultados dos valores de energia de interação eletrostática e de van der Waals são apresentados na Tabela 3. Na Figura 34 é possível observar a geometria final das otimizações. A Figura 34 revela que há uma geometria favorecida na interação dos grupos boronatos dos ácidos borônicos com o íon divalente do zinco. Devido à sua distribuição de cargas, esta geometria é preferencial devido à interação eletrostática entre a carga negativa do grupo boronato e a carga positiva do íon de zinco. Isto decorre, evidentemente, da própria parametrização destes elementos no campo de Força OPLS-2005. Neste campo de força, a distribuição de cargas parciais sobre o grupo boronato impõe uma mesma densidade de carga parcial sobre os átomos que o constituem independente dos grupos ligados ao mesmo. Isto causa certa incorreção nas geometrias obtidas visto que alguns dos grupos ligados (tais como o grupo alil) na molécula do ácido alilborônico, podem mudar sensivelmente a carga parcial dos elementos presentes no boronato.

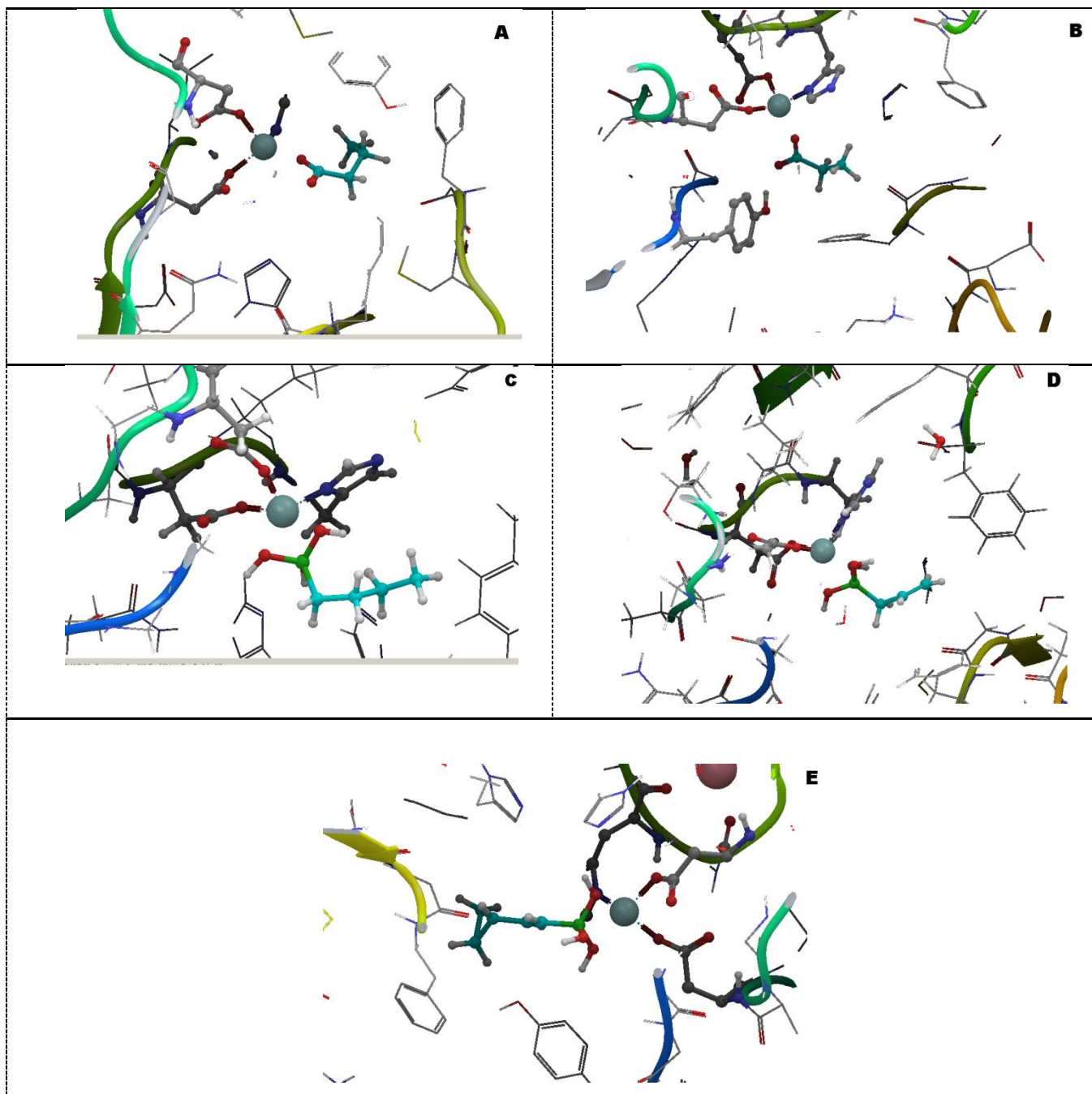
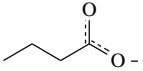
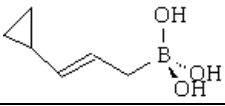
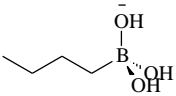
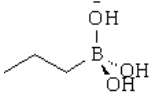
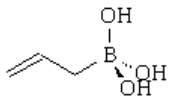


Figura 34 Geometrias finais obtidas nos cálculos de dinâmica estocástica das espécies químicas estudadas. A-Butirato; B-Propilboronato; C-Butilboronato; D-Alilboronato; E- Ciclopropilvinilboronato

Tabela 3. Resultado das interações eletrostáticas e de Van der Walls dos inibidores com a proteína.

Inibidor	Interação Eletrostática (kcal/mol)	Interação de Van der Walls (kcal/mol)	RMSD
Butirato (composto referência) 	- 4,62	+ 1,93	0,0352
Ciclopropilvinilboronato 	- 53,21	- 12,09	1,2852
Butilboronato 	- 55,49	+ 1,36	1,3851
Propilboronato 	- 105,34 I	- 7,73	1,2688
Alilboronato 	- 108,71	- 10,89	1,3975

Os resultados revelaram que a interação dos ácidos borônicos com as proteínas é favorecido. É notável, nos resultados, que a redução no tamanho da cadeia carbônica destes ácidos resulta em um aumento na interação. Devido à cavidade no sítio ativo localizar-se próxima à superfície externa da enzima e ao fato de as cadeias de ácidos borônicos serem pequenas, as cadeias carbônicas destes ácidos interagem com poucos aminoácidos, de forma que a interação predominante entre as moléculas e a proteína deriva da força coulômbica entre o boronato, o íon zinco e o aminoácido tirosina (Tyr287). Este último devido a uma ligação de hidrogênio causada pela hidroxila. De fato, a interação de Van der Walls, em alguns dos compostos testados, desfavorece a interação com valores de energia ligeiramente positivos. Em todos os compostos testados, um dos hidrogênios do grupo boronato forma uma ligação de hidrogênio com a hidroxila da tirosina (Tyr287). O grupo alceno da molécula do ácido alilborônico produz um efeito indutivo que favorece a interação eletrostática com o zinco quando comparada com a interação ácido propilborônico.

Além disso, devido à sua geometria, os átomos do grupo boronato formam duas ligações de hidrogênio com a tirosina próxima. O ácido trans-2-ciclopropilborônico mostra uma geometria de interação na cavidade ligante bastante diferente dos demais ácidos borônicos. O anel ciclopropil interage com o anel aromático de dois aminoácidos fenilalanina (Phe 133 e Phe 189) estabelecendo uma distância média de ambos de aproximadamente 3,5 Å (Phe 133) e 3,9 Å (Phe 189). De fato, este foi o ácido borônico com maior percentual de interação de Van der Waals entre os compostos testados. Entretanto, por causa do favorecimento da interação de Van der Waals, a interação eletrostática é desfavorecida devido ao deslocamento da geometria de interação do grupo boronato com o íon de zinco e a perda da ligação de hidrogênio com a tirosina, sendo que o efeito global é a redução da energia de interação. A ligação de hidrogênio da tirosina, neste caso, é causada por uma interação entre o hidrogênio da hidroxila da tirosina e o oxigênio do boronato.

Além da energia de interação, foram avaliadas também as distâncias interatômicas como indicativos da natureza das interações envolvidas. O grupo boronato dos ácidos borônicos forma sempre uma geometria na qual os oxigênios deste grupo interagem com o íon de zinco. As distâncias são mostradas na Tabela 4 e na Figura 35.

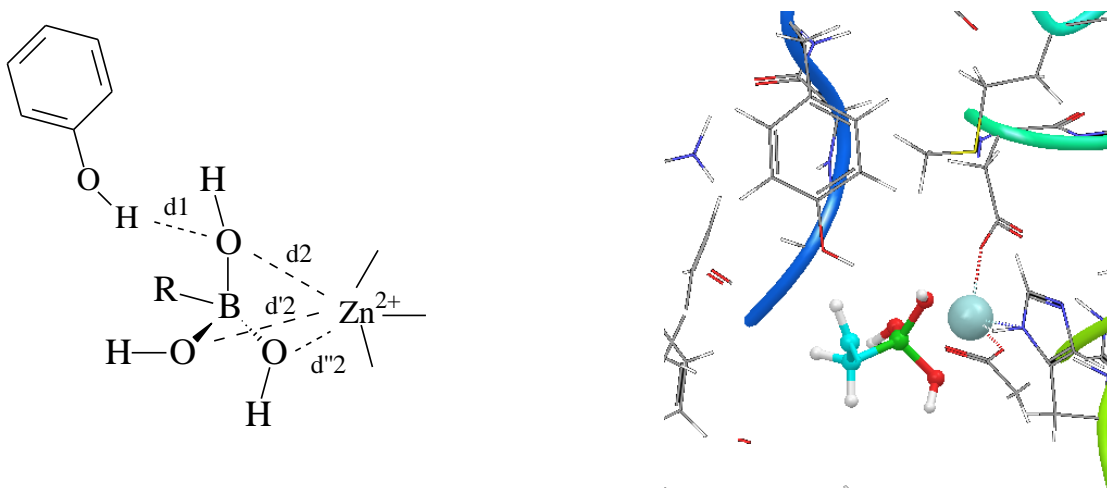
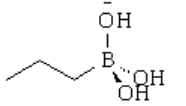
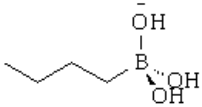
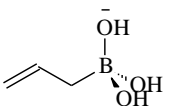
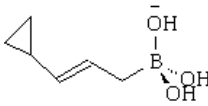


Figura 35. Representação das distâncias inter-atômicas obtidas nas geometrias finais das simulações.

Tabela 4 Valores das distâncias entre os átomos

Inibidor	d1 (Å)	d2 (Å)	d'2 (Å)	d''2 (Å)
Ácido propilborônico 	1,98 Å	2,11 Å	2,15 Å	2,17 Å
Ácido butilborônico 	2,83 Å	2,22 Å	2,06 Å	2,29 Å
Ácido alilborônico 	2,30 Å / 2,36 Å	2,09 Å	2,03 Å	2,06 Å
Ciclopropilvinilboronat 	3,20 Å	2,14 Å	1,92 Å	3,47 Å

Os resultados da simulação demonstram claramente que há um favorecimento da interação inibidor-proteína com as moléculas de ácidos borônicos. A geometria assumida pelas moléculas demonstra uma interação eletrostática forte entre os átomos de oxigênio ricos em densidade eletrônica e o cátion de zinco. A ordem de grandeza destas distâncias mostra que estas interações são comparáveis às ligações de hidrogênio. Há, portanto, uma

evidente contradição entre os resultados experimentais e o resultado das simulações procedidas aqui. Discutimos algumas possíveis causas desta discrepância entre os valores teóricos e experimentais.

9.1 A inatividade nos ensaios *in vitro* dos compostos borônicos

A provável causa da inatividade de moléculas pequenas de ácidos borônicos é a degradação dos ácidos borônicos no micro-organismo. Dois mecanismos principais são aceitos como via de metabolização de ácidos borônicos: a próton-deboronação (que consiste, essencialmente de uma hidrólise) e a deboronação oxidativa, uma oxidação promovida por espécies reativas do oxigênio em moléculas boriladas. O mecanismo proposto para “próton-deboronação” é apresentado no esquema abaixo. Este mecanismo consiste em uma hidrólise na qual uma molécula de água se coordena ao boro e ao átomo de carbono criando um estado de transição que resulta nos produtos: ácido bórico e a cadeia carbônica livre (Figura 36).¹⁰⁵ Neste estado de transição, a entalpia padrão de formação do mesmo é relativamente alta o que sugere que este não deve ser o mecanismo predominante de metabolismo exceto em alguns casos no qual o ácido borônico é um forma isomérica de alguns compostos contendo uma ligação nitrogênio-carbono o que favoreceria a outra forma isomérica e, portanto, esta via de metabolismo.

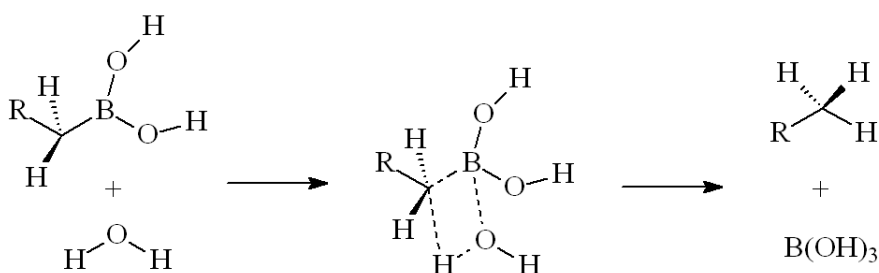


Figura 36 Mecanismo proposto para a degradação de ácidos borônicos nos organismos vivos.

A outra via proposta para o metabolismo de ácidos borônicos é a deboronação oxidativa. Esta via metabólica seria promovida pela enzima P450. A enzima P450,

responsável pelo metabolismo da maior parte dos fármacos, promove a oxidação de ligações químicas normalmente inertes a oxidação (como a ligação carbono hidrogênio C-H). As evidências sugerem que esta oxidação ocorre através de um íon ferro (IV) ligado a um átomo de oxigênio (espécie química chamada de ferril). Esta espécie química sofre uma alteração (variando entre um cátion e um cátion radicalar). Assim, o mecanismo proposto, sugere que esta espécie química abstrai um hidrogênio do substrato formando uma espécie ferro(IV)hidroxilado que rapidamente se recombina com o substrato formando o produto hidroxilado. Os estudos mecanísticos também indicaram um forte efeito isotópico para o hidrogênio sugerindo que o tunelamento de hidrogênio esteja envolvido neste processo. ¹⁰⁶ Uma importante dedução dos estudos recentes é a dependência entre o tamanho da cadeia carbônica e a cinética de oxidação pela enzima. Em uma proposta alternativa os ácidos borônicos seriam degradados pela enzima P450 através de uma espécie peroxil que ativaria a ligação boro-carbono para promover a degradação em uma oxidação semelhante ao mecanismo da reação Baeyer-Villiger ¹⁰⁷ (Figuras 37 e 38).

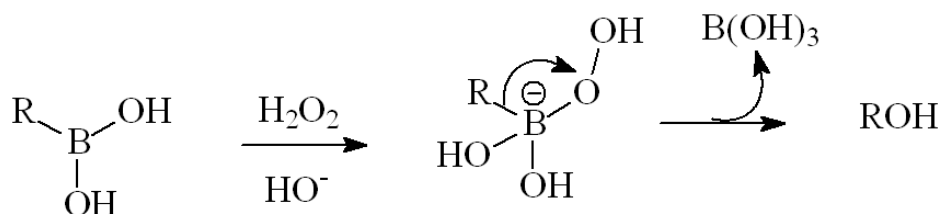


Figura 37 Mecanismo proposto da deboronação oxidativa

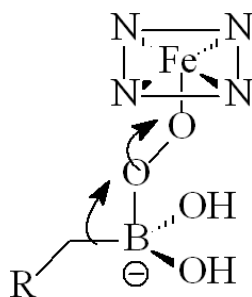


Figura 38 Intermediário proposto na enzima P450

É importante destacar que no micro-organismo testado, o *T. cruzi*, há uma organela chamada de peroxissomo que provavelmente deva contribuir de forma determinante para a degradação de compostos. A organela peroxissomo possui formato aproximadamente esférico (cerca de 0,7 µm de diâmetro) é randomicamente distribuída no citoplasma. Esta possui membranas com enzimas catalases e oxidases produtoras de H₂O₂.¹⁰⁸ É, portanto, provável que esta via metabólica seja a causa da inatividade dos compostos testados visto que os mesmos devem ter sofrido deboronação oxidativa antes de formar o complexo enzima-inibidor.

Capítulo 10

Estudo do mecanismo de inibição da histona deacetilase por ácidos graxos de cadeia curta.

10.1 A homologia entre as histonas

A maior parte das estruturas cristalográficas de enzimas histonas deacetilases disponíveis são enzimas humanas. Não há uma estrutura cristalográfica de uma HDAC de *T. cruzi*. Assim, para demonstrar a viabilidade do estudo proposto, mostramos aqui o nível de homologia sequencial (alinhamento de sequencias) e homologia estrutural entre as HDAC.

O alinhamento de sequência revela um elevado nível de homologia entre as enzimas humanas (ver Tabela 5). As estruturas cristalográficas de enzimas HDAC não humanas disponíveis são apenas de micro-organismos bacterianos. Há, entretanto, uma sequência determinada de histona deacetilase do protozoário *T. cruzi* a qual apresente um nível de homologia estrutural igual a 34% com a HDAC humana. Normalmente, um nível de homologia sequencial superior a 25% (em uma cadeia com mais de 80 aminoácidos) indica um nível significativo de homologia estrutural ¹⁰⁹. Portanto, no caso das enzimas HDAC não humanas, o nível de homologia sequencial (ver Tabela 5) indica um nível razoável de estrutural.

Tabela 5. Homologia Sequencial de Enzimas HDAC.

Alinhamento sequencial (identidade)					
	Código P.D.B.				Código Uniprot
	1T64 <i>(H. sapiens)</i>	2V5W <i>(H.sapiens)</i>	1ZZ1 <i>(A.bacterium)</i>	1C3P <i>(A.eolicus)</i>	Q4DLI6 <i>(T. cruzi)</i>
1T67	96%	96%	26%	33%	34%

Os estudos de homologia com enzimas humanas revelam um elevado alinhamento estrutural (Figuras 39 e 40). As estruturas de enzimas não humanas também revelam um significativo grau de homologia, como esperado devido ao nível de homologia sequencial.

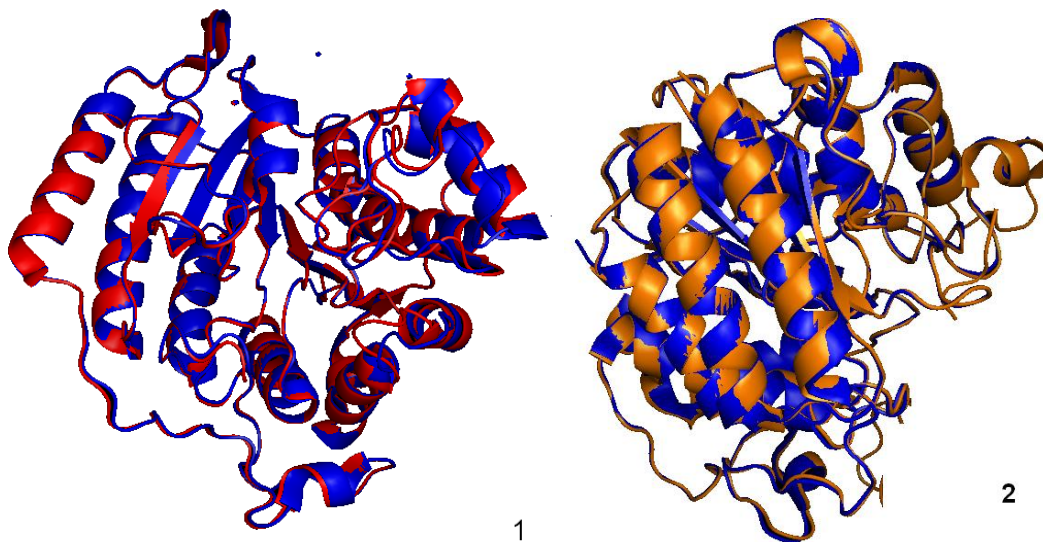


Figura 39. Comparação entre a estrutura da HDAC humana (em azul, código P.D.B. 1T67), e estrutura da HDAC também humana (em vermelho, código P.D.B. 1T64) e em 2) comparação entre esta mesma estrutura e a estrutura da HDAC humana (em amarelo, código P.D.B. 2V5W). Em ambos os casos, o há um elevado nível de homologia estrutural.

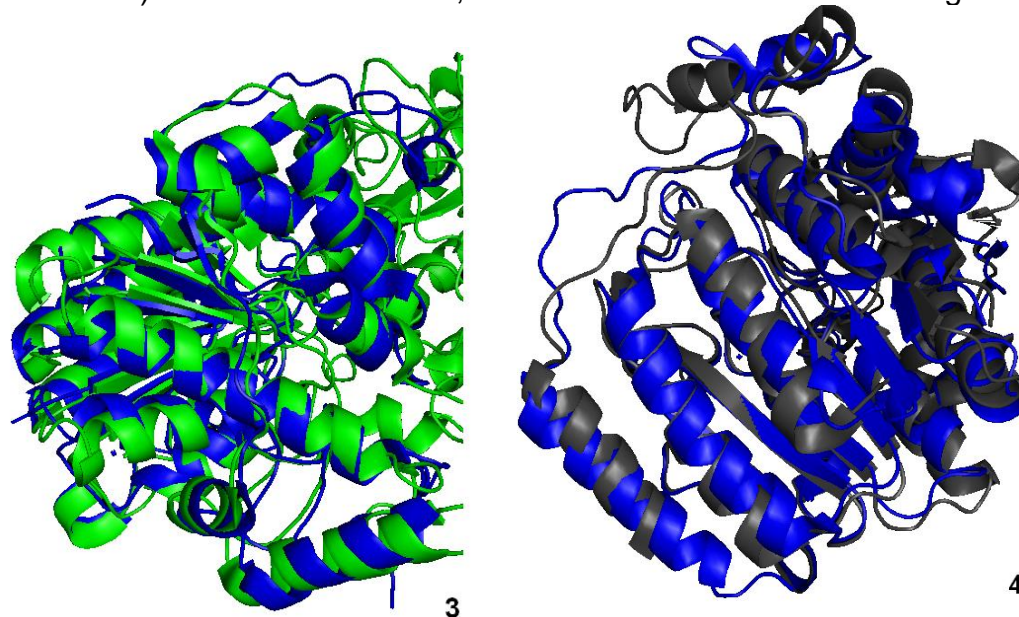


Figura 40 Comparação entre as estruturas da HDAC humana (em azul) e a HDAC bacteriana da *Alcaligenaceae bacterium* em 3 (em verde, código PDB 1ZZ1) e com a HDAC da bactéria extremófila *Aquifex eolicus* (em 4, em cinza, código PDB 1C3P). O nível de homologia estrutural também é significativo, como pode ser visto na superposição das estruturas.

Neste trabalho utilizamos a estrutura da histona deacetilase humana (código P.D.B. 1T67) para executar os cálculos. Baseados nos resultados de homologia, consideramos que há um nível satisfatório de homologia entre as enzimas para permitir um estudo por simulação computacional.

10.2 O Sítio Ativo da Histona Deacetilase

O sítio ativo da enzima histona deacetilase sofre variações significativas em sua estrutura considerando as estruturas cristalográficas disponíveis. Este sítio apresenta, essencialmente, um íon divalente de zinco (Zn^{2+}) complexado com aminoácidos, especialmente aminoácidos com cadeia lateral carregada (aspartato) e com cadeia lateral nitrogenada (histidina). O íon Zn^{2+} comporta-se como um ácido de Lewis dentro desta estrutura o que é evidenciado pela formação de ligação química entre este átomo e as “bases de Lewis” próximas a ele, isto é, observa-se uma transferência de densidade eletrônica entre os grupos ricos em densidade eletrônica (ver Figura 41), tais como o nitrogênio da cadeia lateral do aminoácido histidina e o os átomos de oxigênio carboxílicos de aminoácidos como o ácido aspártico e o íon de zinco. Na estrutura 1T67, a qual corresponde à estrutura cristalográfica de uma histona deacetilase humana da classe HDAC8 complexada com um ácido hidroxâmico, o íon de zinco está a uma distância de aproximadamente 2,00 Å dos átomos de nitrogênio da histidina (HIS381) e oxigênio das carboxilas das cadeias laterais das moléculas de ácido aspártico (ASP267 e ASP178). Isso revela que este átomo encontra-se em uma estrutura similar a de um complexo metálico *quelado* a cinco grupos ligantes (considerando-se os dois átomos do inibidor ácido hidroxâmico). O inibidor ácido hidroxâmico promove, portanto, a inibição da enzima histona deacetilase com uma configuração similar à configuração do substrato ligado ao sítio ativo da enzima, ligando-se ao átomo de zinco do núcleo ativo desta metalo enzima (ver Figura 42).

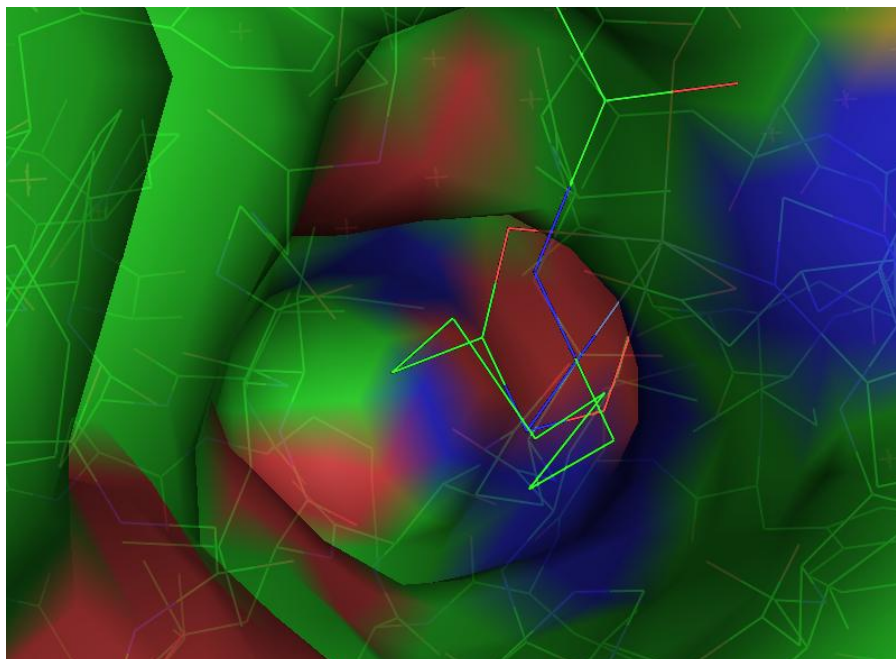


Figura 41 Sítio ativo da histona deacetilase (PDB 1T67). A cor vermelha indica densidade de carga negativa. A cor azul indica a densidade de carga positiva

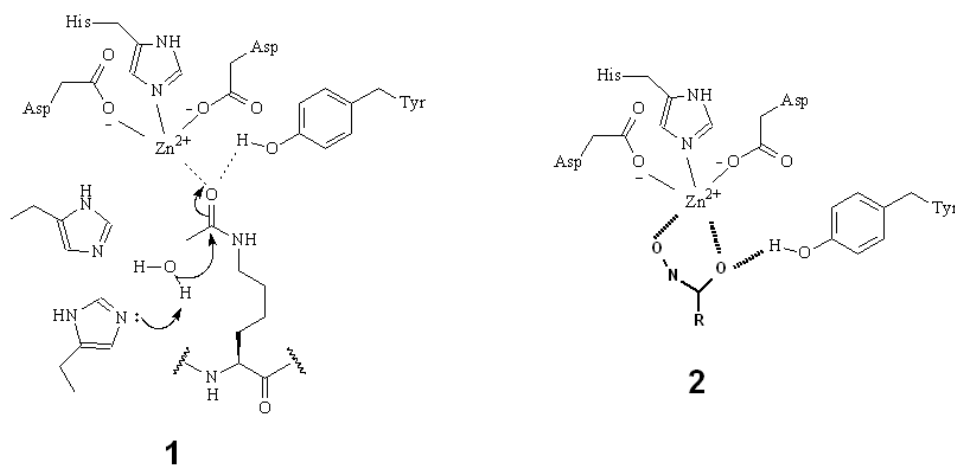


Figura 42 Estrutura do sítio ativo. 1) do núcleo da metalo enzima com o substrato (a cadeia lateral da acetil-lisina) e 2) na estrutura complexada com um ácido hidroxâmico.

Um detalhe muito importante sobre esta estrutura é a presença de um aminoácido tirosina no sítio ativo da enzima. Este aminoácido forma uma *ligação de hidrogênio* bastante forte que é fundamental para atividade catalítica da enzima. Na histona deacetilase, a tirosina forma uma ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico da cadeia lateral do aminoácido acetil-lisina promovendo a hidrólise desta espécie química. Uma alternativa para

se estudar o mecanismo desta catálise é considerar este núcleo ativo da enzima como um íon complexo metálico de zinco e sendo cada cadeia lateral correspondente a um íon complexo de zinco. Na geometria em que se encontra na estrutura complexada com o inibidor competitivo, o átomo de zinco está ligado à proteína através de quatro diferentes grupos químicos com uma geometria aproximadamente *quadrado planar*. Considerando-se a teoria de ligação de valência, poderíamos tratar este átomo de zinco com orbitais híbridos dsp^2 . Durante a inibição competitiva (ou durante a catálise da hidrólise da acetil-lisina) esta hibridização sofre alteração o que constitui a base da atividade catalítica desta enzima.

Uma característica bastante revelante deste sítio ativo é a presença de muitos grupos carregados (carboxilatos principalmente) da cadeia lateral do aminoácido aspartato. De fato, a cadeia lateral do aspartato é uma das espécies químicas responsáveis pela coordenação do cátion divalente do zinco da enzima histona deacetilase. Visando à compreensão do mecanismo de inibição da histona deacetilase por ácidos carboxílicos de cadeia curta, simulamos a interação deste com a enzima. A Figura 43 demonstra a convergência dos cálculos de minimização de energia que precedem os cálculos de dinâmica estocástica nas simulações dos ácidos carboxílicos de cadeia curta no sítio ativo. Os gráficos sugerem que há uma boa convergência nas minimizações de energia.

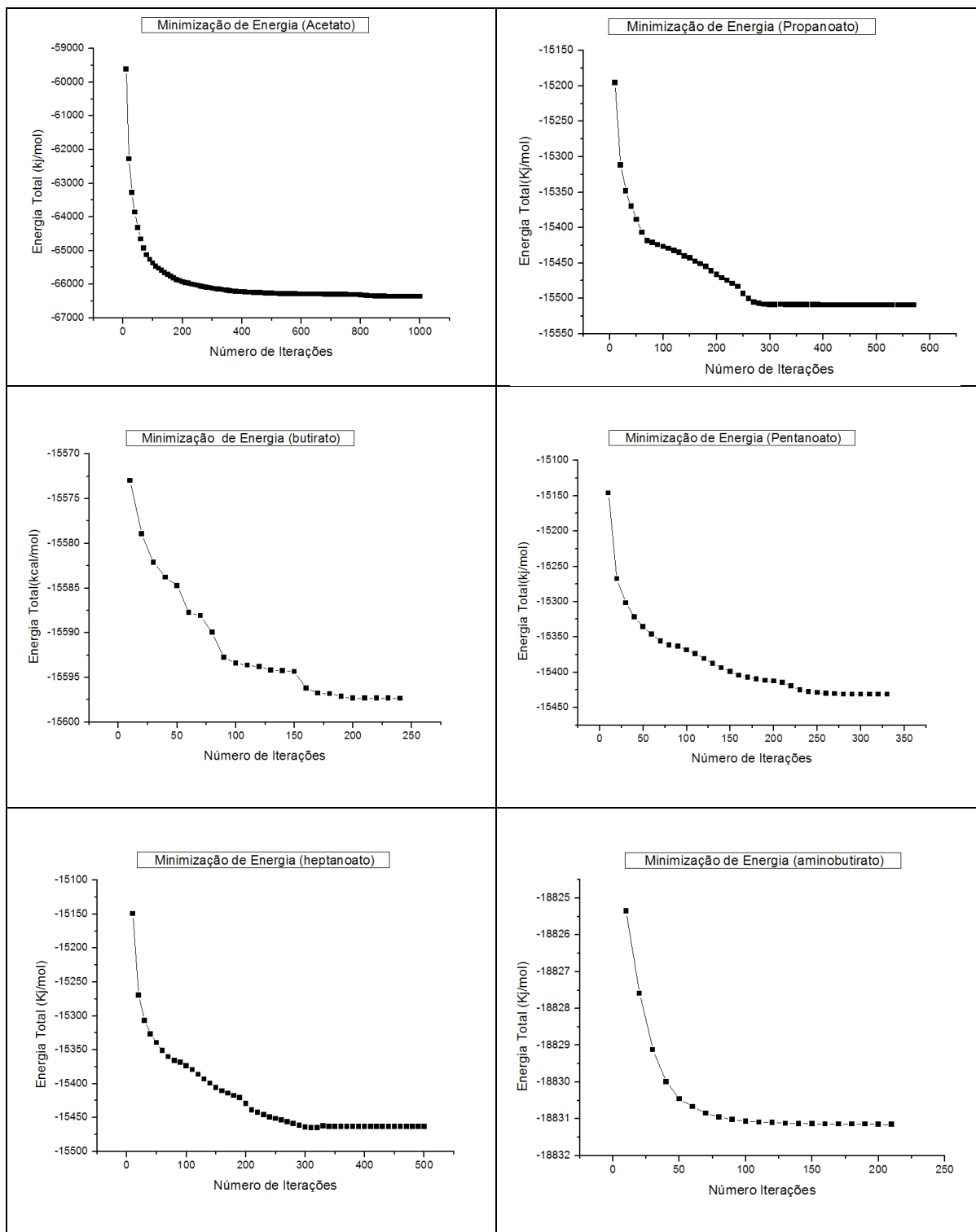

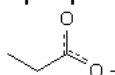
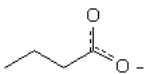
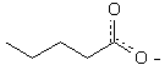
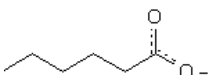
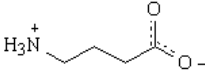
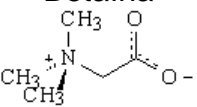


Figura 43 Relação entre energia e número de iterações para as minimizações de energia das estruturas contendo os inibidores ácidos carboxílicos de cadeia curta.

A Tabela 6 e a Figura 44 demonstram os valores de energia de interação dos inibidores com a enzima e as geometrias finais obtidas nas simulações. Os valores de energia positivos indicam interações desfavorecidas enquanto os valores de energia negativos indicam interações favorecidas (provável atividade inibitória do composto). Valores e energia positivos podem indicar que as espécies químicas são mais estáveis termodinamicamente livres do que associadas em um complexo inibor-proteína. O acetato, portanto, não apresenta, segundo esta simulação atividade inibitória sobre a histona deacetilase. Entretanto, este modelo não reproduz a atividade do propanoato o qual, experimentalmente, é um bom inibidor da HDAC. Os dados experimentais disponíveis na literatura e as simulações realizadas neste trabalho mostram que o butirato tem uma interação favorecida com a enzima histona deacetilase em relação aos outros ácidos carboxílicos de cadeia curta, tais como o ácido propanóico. A causa aparente disto parece ser o volume de Van der Waals dos inibidores. O ácido butírico mimetiza a cadeia lateral do aminoácido aspartato o qual está presente como complexante do íon de zinco e possui volume adequado para interagir com o núcleo metálico da enzima e com os aminoácidos mais próximos da cavidade ligante. Uma interação bastante relevante, por exemplo, ocorre com o aminoácido histidina (HIS161) o qual comporta-se como um quelante do metal e cuja cadeia lateral interage de forma otimizada com o ácido butírico. A cadeia com seis carbonos (o ácido hexanóico) é volumosa o suficiente para interagir com moléculas externas a proteínas (como moléculas de água) e com aminoácidos de fora da cavidade ativa o que aparentemente desfavorece a ligação proteína-receptor.

As geometrias de finais obtidas indicam uma interação eletrostática entre o carboxilato (rico em densidade eletrônica) e o íon de zinco com densidade de carga positiva. É importante destacar, entretanto, que a parametrização afeta bastante esta geometria, visto que no carboxilato a densidade eletrônica encontra-se igualmente distribuída entre os átomos o que não é bem descrito pela parametrização.

Tabela 6. Valores de energia interação eletrostática e de Van der Walls obtidos pela dinâmica estocástica dos compostos.

Composto	Interação eletrostática (kcal/mol)	Interação de Van der Walls (kcal/mol)
<p>Ácido acético</p> 	+ 816	- 1,52
<p>Ácido propanoico</p> 	+ 513	- 1,18
<p>Ácido butírico</p> 	- 4,62	+ 1,93
<p>Ácido pentanoico</p> 	+ 57,65	+86,06
<p>Ácido hexanóico</p> 	+ 38,01	- 25,80
<p>Ácido 4-aminobutírico</p> 	- 63,53	- 12,2
<p>Betaína</p> 	- 156,11	- 16, 24

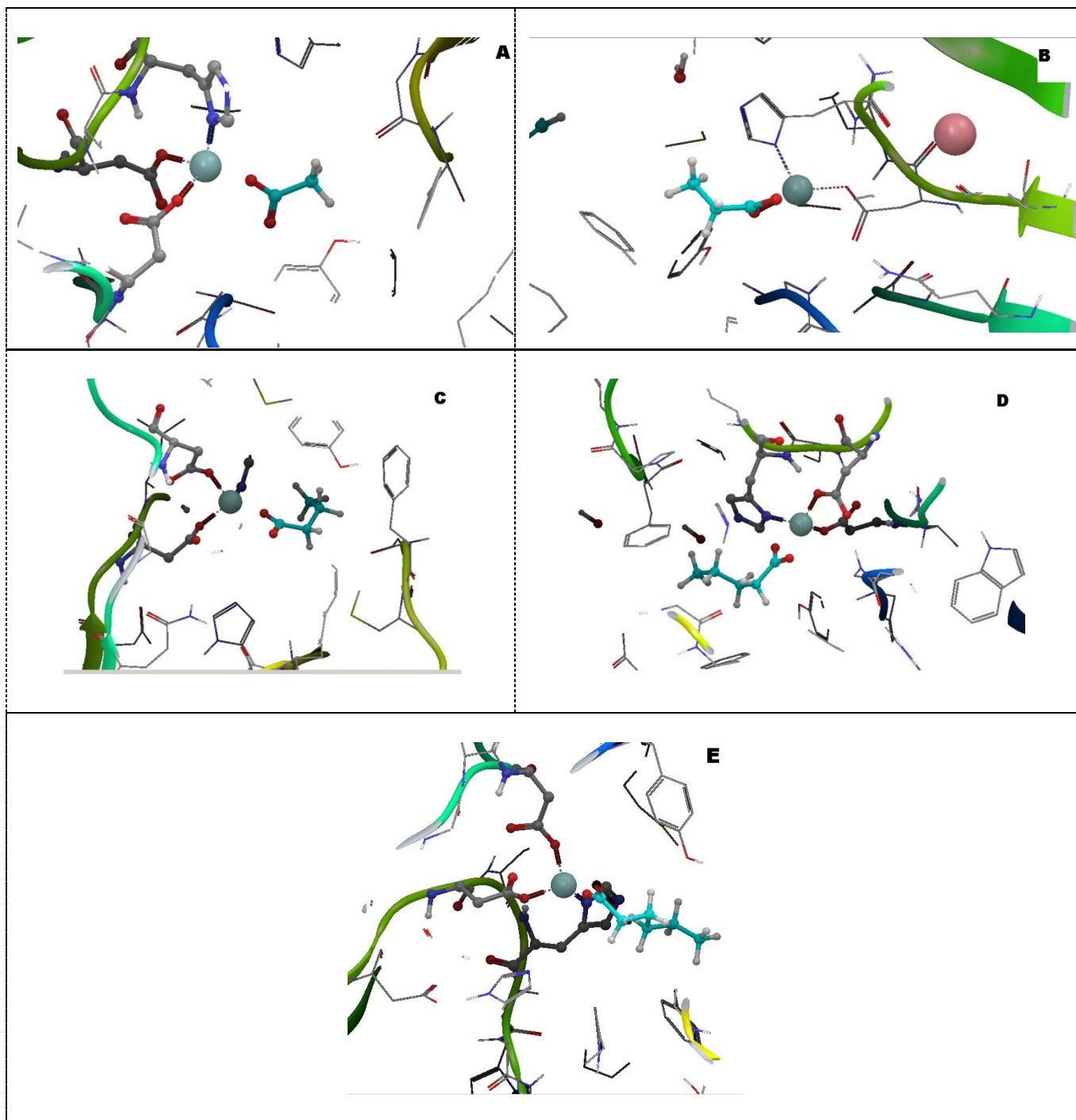


Figura 44 Geometria otimizada. A- Acetato; B-Propanoato; C-butirato ; D-Pentanoato; E- Hexanoato

Por ser uma proteína com muitos aminoácidos carregados ou com momento de dipolo permanente, supomos que um composto com um elevado momento de dipolo ou com cargas permanentes favoreceria a interação inibidor proteína. Avaliamos também as interações da enzima com a molécula da betaína. Betaínas são produtos naturais com o N totalmente metilado. Devido a esta metilação do nitrogênio, betaínas apresentam-se em forma zwitteriônica. Avaliamos a trimetilglicina, a betaína de estrutura química mais simples. A interação, como pode ser visto nos resultados é bastante favorecida. A interação eletrostática é responsável por um significativo ganho de estabilidade observado neste sistema. Já é bem conhecido que a trimetilglicina possui atividade epigenética. Entretanto, este efeito era atribuído, até agora, à capacidade deste composto de doar grupos metil para a homocisteína o que favoreceria a metilação das ilhas CpG no ADN. Nossos resultados, contudo, sugerem que a betaína possa participar ativamente da regulação epigenética através da inibição da HDAC.

10.3 Evidência da presença de um sítio alostérico no mecanismo de inibição da HDAC por ácido graxos de cadeia curta

Um aspecto relevante do sítio ativo da HDAC é que próximo a este sítio há uma cavidade contendo um metal alcalino (sódio ou potássio). Esta cavidade, doravante denominada *sítio vicinal*, dista cerca de 7,00 Å do sítio ativo e considerando que, adicionalmente, a cadeia de peptídeos que estabiliza o metal desta cavidade também é rica em aminoácidos aspartatos, o que demonstra algumas semelhanças desta cavidade com a cavidade ligante. (Figura 45).

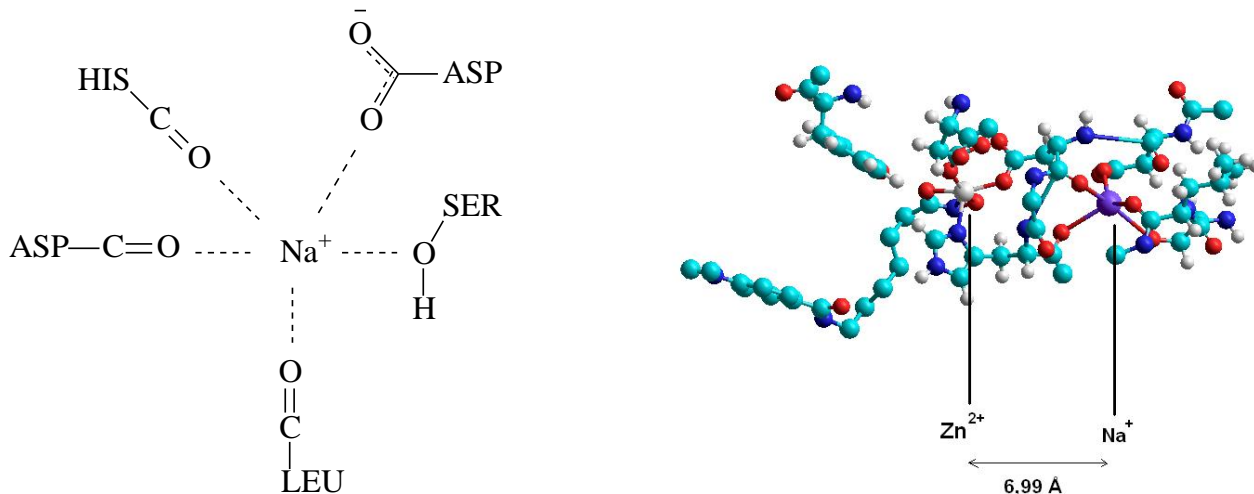


Figura 45 representação do sítio vicinal da histona deacetilase

A função deste sítio vicinal ainda não está totalmente esclarecida, mas o metal alcalino parece estabilizar a estrutura do complexo substrato/proteína através da interação eletrostática entre este metal (sódio ou potássio) e o oxigênio peptídico das cadeias de aminoácidos da cavidade ligante, mantendo assim a geometria do sítio ativo. Este fato fica evidenciado na estrutura cristalina do Histono deacetilase (HDAC8) complexada ao substrato no arquivo 2V5W do *Protein Data Bank*. A dinâmica estocástica da proteína na ausência do íon de metal alcalino revela que há um ganho de estabilidade originada da presença deste íon na estrutura é 297,19 kcal/mol correspondendo assim, a um significativo ganho de estabilidade. Além disso, a estrutura do sítio ativo sofre uma alteração em sua geometria quando há a remoção deste íon. A ligação de hidrogênio do aminoácido tirosina 286, por exemplo, é eliminada na ausência do cátion de metal alcalino do sítio vicinal.

Para investigar a participação do sítio vicinal no mecanismo de inibição da histona deacetilase pelo ácido butírico, simulou-se a interação deste ácido com a enzima em duas estruturas distintas: com a interação restrita ao sítio ativo e a interação eletrostática entre o ácido carboxílico e o cátion Zn^{2+} e, no outro caso, este mesmo ácido interagindo tanto no sítio ativo (íon Zn^{2+}) como também no sítio vicinal, interagindo com o cátion Na^+ , presente nesta outra cavidade (Figura 46).

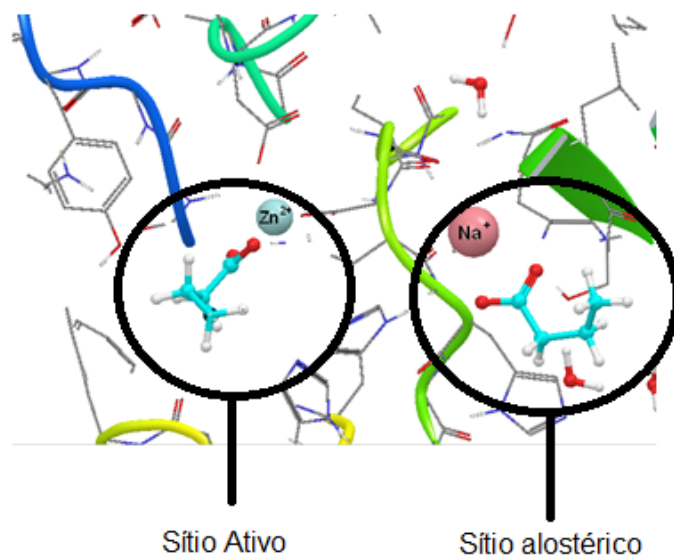


Figura 46 Representação da interação do ácido butírico no sítio ativo e no sítio vicinal

A Figura 47 apresenta a convergência nos cálculos dos ácidos carboxílicos de cadeia curta quando simulados simultaneamente no sítio ativo e vicinal. Os gráficos indicam que há uma boa convergência na minimização de energia nestes casos.

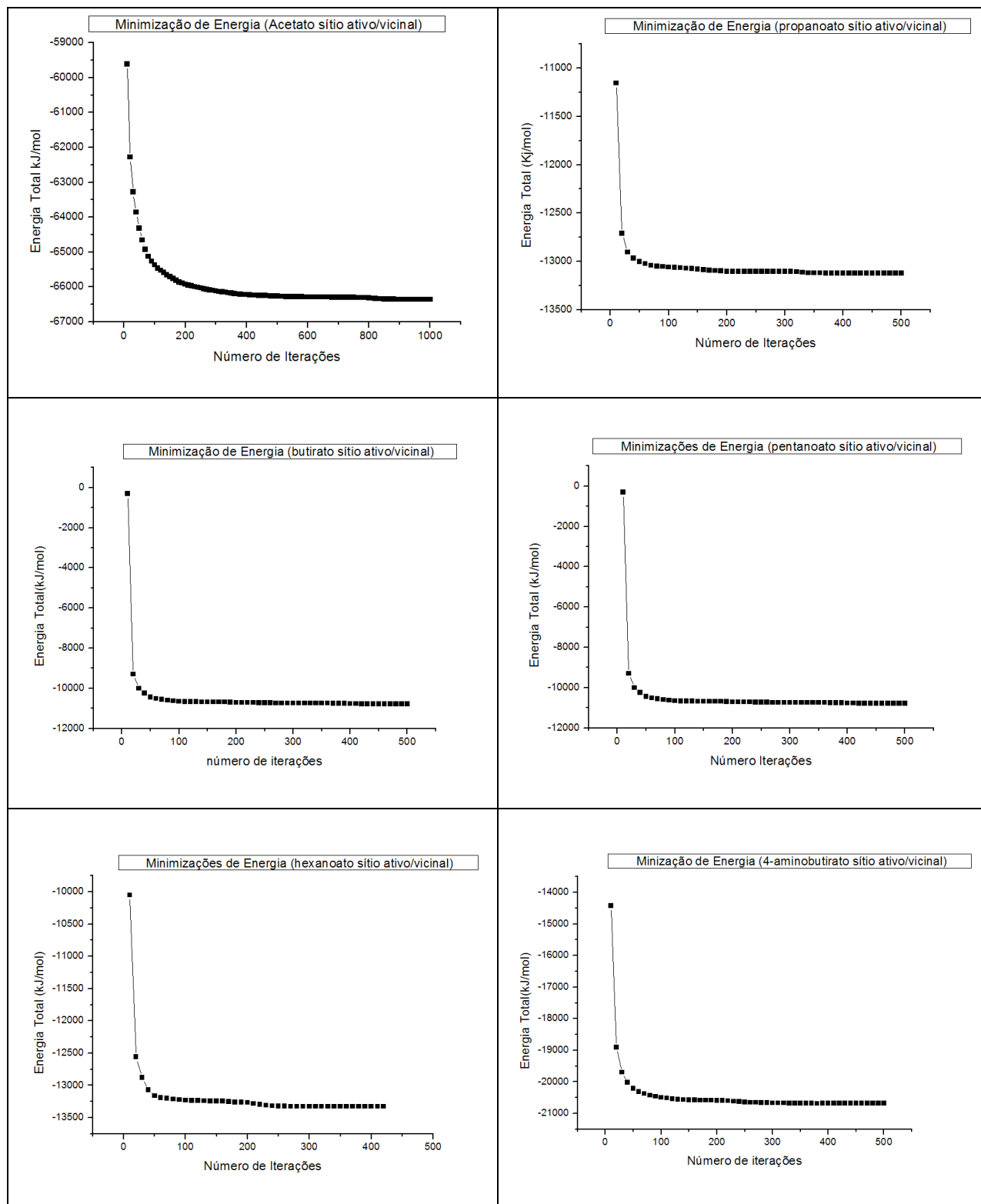



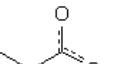
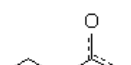


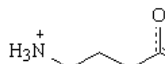
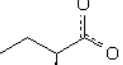
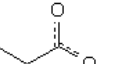
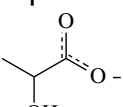
Figura 47 Relação entre energia e número de iterações para as minimizações de energia das estruturas conteno os inibidores ácidos carboxílicos de cadeia curta no sítio ativo e vicinal.

A Tabela 7 e a Figura 48 apresentam os resultados dos valores de energia da simulação e as geometrias finais obtidas nos cálculos. O resultado mais interessante é obtido quando se posiciona o ácido butírico simultaneamente no sítio ativo e no sítio vicinal contendo o metal alcalino: há um ganho de interação tanto eletrostática quanto de Van der Walls (que no caso da interação exclusiva no sítio ativo chega a ser desfavorecido) o que sugere que o sítio vicinal pode contribuir de forma importante no mecanismo de inibição da HDAC por ácidos graxos de cadeia curta. Isso significaria que o mecanismo de inibição promovido pelo ácido butírico é uma combinação de inibição competitiva com participação do sítio vicinal. A interação de ácidos carboxílicos com anel aromático em sua cadeia lateral favorece a atividade inibitória sobre histona deacetilase. Os cálculos e uma inspeção do sítio receptor revelam que a interação é favorecida pela interação entre as nuvens eletrônicas do anel aromático do inibidor com os aminoácidos fenilalanina, presentes na cavidade ativa da enzima (os aminoácidos Phe 133 e Phe 189).

O aumento na energia de interação eletrostática devido ao sítio vicinal explica, portanto, a inibição da enzima causada por estes compostos. Isso implicaria em um mecanismo no qual os ácidos graxos de cadeia curta entrariam no sítio ativo através do canal e migrariam em direção ao sítio vicinal cuja presença do K^+ ou Na^+ estabilizaria a espécie química carboxilato. O contato entre as duas cavidades possui um volume reduzido (obtido pelo estudo da superfície de van der Walls) o que limita a passagem de moléculas com cadeia longa. Isso explicaria porque os ácidos graxos apresentam um sítio alostérico no mecanismo de inibição da histona deacetilase enquanto ácidos de cadeia lateral longa não o apresentam. Logo, o acetato, cuja cadeia lateral é muito pequena, não é capaz de inibir a atividade da histona deacetilase visto que seu pequeno volume permite o mesmo que seja eliminado através da cavidade vicinal sem que cause mudanças estruturais significativas na cavidade ativa (e promova a inibição desta forma). O ácido propanóico, por outro lado, possui uma cadeia lateral maior, mas suficientemente pequena para atravessar o canal que liga a cavidade ativa com a cavidade vicinal. A cadeia do ácido propanóico permite um aumento na interação com os aminoácidos de cadeia lateral hidrofóbica, presentes na cavidade vicinal, o que permite a esta espécie química interagir com a enzima de forma a inibi-la em um mecanismo combinado no sítio ativo e vicinal ('alostérico'). O ácido butírico possui uma cadeia lateral ainda maior, mas ainda pequena o suficiente para atravessar o

canal que permite a passagem de espécies químicas entre as duas cavidades. A interação de van der Waals, é ainda mais expressiva com este ácido e a atividade inibitória é mais efetiva do que a com o ácido propanóico. O ácido α -metil butírico tem um aumento na interação em relação ao ácido butírico. Neste caso, a cadeia lateral do ácido é suficiente para permitir a passagem para o sítio vicinal. A metila presente no carbono alfa desta espécie química faz com que haja um aumento na interação hidrofóbica tanto no sítio alostérico quanto no sítio vicinal aumentando desta forma a atividade inibitória deste ácido.

Tabela 7 Valores de energia de interação de ácido carboxílicos de cadeia curta

Composto	Interação eletrostática (kcal/mol)		
	Sítio Ativo	Sítio ativo/vicinal	RMSD (Sítio ativo/vicinal)
Acetato 	+ 816	+ 68,31	1,3450
Propanoato 	+ 513	- 23,87	1,8374
Ácido butírico 	- 4,62	- 28,81	1,1461
Pentanoato 	+ 57,65	+ 414,33	1,5268
Hexanoato 	+ 38,01	+ 420,51	1,4949
4-aminobutirato 	- 63,53	- 391,43	1,3146
α -metil-butirato 	- 86,63	- 129,32	1,0883
Isobutirato 	- 69,5	- 18,95	1,5725
2-hidroxi-propanoato 	- 128,39	+ 76,15	1,3243

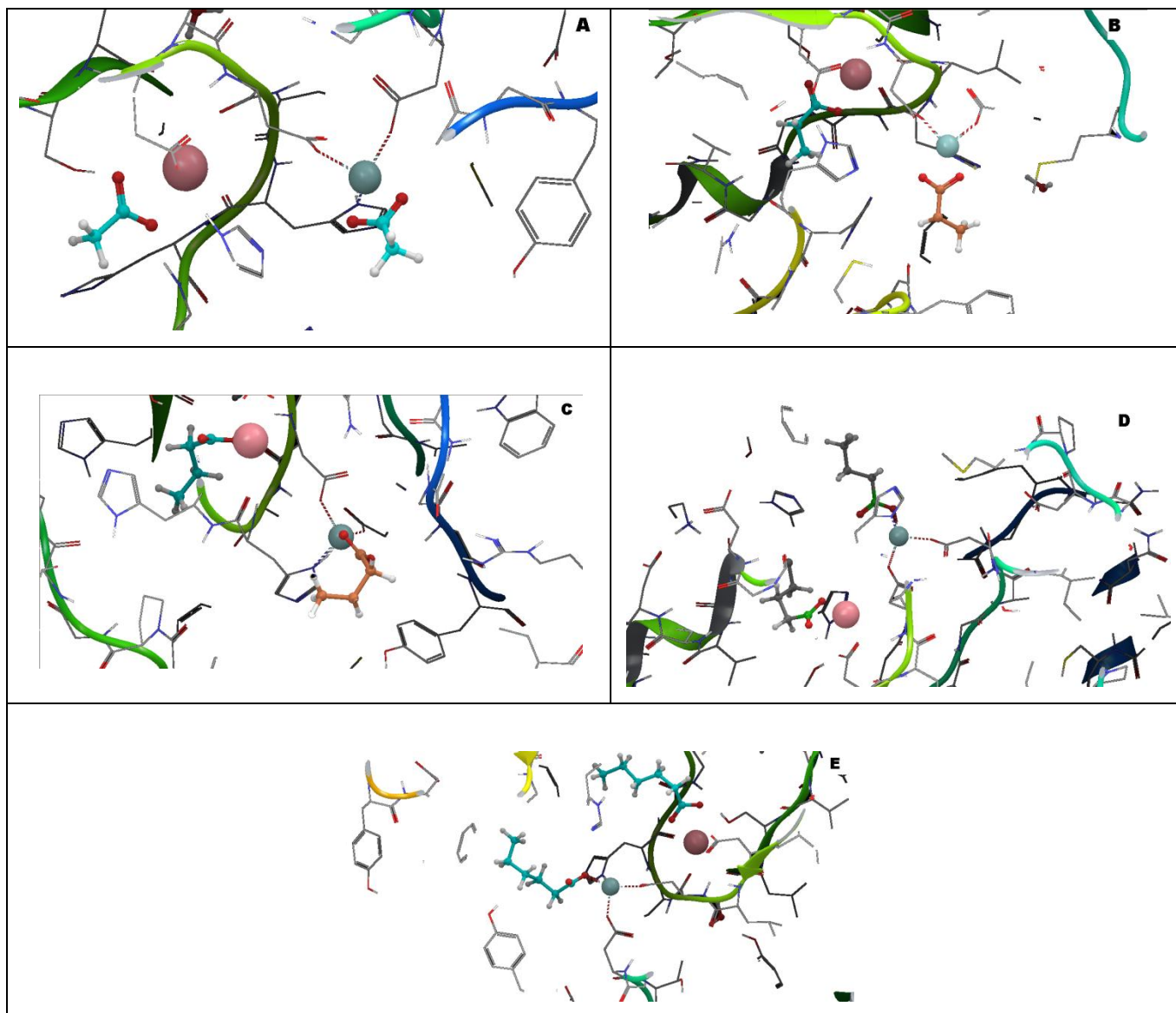


Figura 48 Geometria otimizada das estruturas com interação simultânea no sítio ativo e vicinal. A-Acetato; B-Propanoato; C- Butirato; D- Pentanoato; E-Hexanoato

Os ácidos acético, 2-hidroxi-propanoico, hexanóico e 4-aminobutírico demonstram valores de energia desfavoráveis à interação com a HDAC enquanto os ácidos propanóico, butírico e α -metil-butírico mostram uma interação bastante favorecida com a enzima, o que implica em uma atividade inibitória significativa sobre esta enzima. Na Tabela 8 são apresentadas comparações entre os resultados experimentais (da literatura) e teóricos obtidos em nossa pesquisa.

Tabela 8 Comparação entre os resultados experimentais, os resultados de dinâmica estocástica considerando a inibição competitiva e resultados da dinâmica considerando o sítio ativo e o alostérico. O sinal positivo (+) indica uma atividade inibitória ou interação inibidor-enzima favorecida. O sinal negativo (-) indica atividade inibitória ou interação inibidor-enzima desfavorecida.

Composto	Atividade inibitoria sobre a HDAC	Simulação da inibição competitiva	Simulação da inibição competitiva e alostérico
Acetato 	-	-	-
Propanoato 	+	-	+
Butirato 	+	+	+
Pentanoato 	-	-	-
Hexanoato 	-	-	-
4-aminobutirato 	-	+	+
α -metil-butirato 	+	+	+
Isobutirato 	+	+	+
2-hidroxi-propanoato 	-	+	-

O favorecimento da interação no sítio vicinal deriva da interação eletrostática entre os carboxilatos e o íon metálico (Na^+ ou K^+) presentes no sítio vicinal. Ácidos graxos de cadeia curta, tais como o ácido propanóico e o ácido α -metil-butírico, possuem uma interação muito fraca com o sítio ativo. Desta forma, quando estas espécies químicas são simuladas apenas no sítio ativo, o resultado da interação indicará a ausência ou pode subestimar a atividade dos mesmos.

Ácidos análogos do ácido butírico substituídos na posição 4 (no último carbono da cadeia lateral) têm, em geral, atividade inibitória reduzida sobre a histona deacetilase, quando comparado ao ácido butírico, provavelmente devido ao volume limitado da cavidade que liga o sítio ativo com o sítio vicinal, o que impossibilita participação do mecanismo alostérico de um ácido graxo de cadeia maior do que a do ácido butírico (no caso de ácidos graxos saturados).

Quando estas espécies químicas são simuladas no sítio vicinal há um impedimento espacial que causa problemas de convergência devido ao impedimento espacial imposto na simulação. Um aparente desvio deste comportamento é observado quando um anel aromático é substituído no carbono terminal da cadeia dos ácidos graxos de cadeia curta. Ácidos graxos como o fenil-butírico, 4-benzoilbutirato e 3-benzoilbutirato apresentam uma atividade inibitória elevada sobre a enzima histona deacetilase. Isso se deve à interação do anel benzênico presente na cadeia lateral com o aminoácido fenilalanina presente no canal que dá acesso à cavidade ligante. A interação entre os anéis aromáticos (“interação de *stacking*”) é responsável pelo aumento na interação. Entretanto, no caso destas moléculas, o elevado volume não permite que estas espécies químicas sejam capazes de atravessar a cavidade que liga o sítio ligante à cavidade vicinal, sendo que moléculas maiores do que estas têm um mecanismo de inibição baseado exclusivamente na inibição do sítio ativo (mecanismo de inibição competitiva).

Alguns estudos experimentais têm revelado algumas evidências do mecanismo de inibição da histona deacetilase pelos ácidos carboxílicos de cadeia curta ⁶⁴. Estes estudos demonstraram em um estudo com a substituição de algumas posições na cadeia carbônica do ácido butírico que a substituição com grupo amino ($-\text{NH}_2$) e hidroxila ($-\text{OH}$) reduz a atividade do inibidor. Substituintes alquil também reduzem a capacidade de inibição da histona deacetilase pelos ácidos carbônicos de cadeia curta. Entretanto, a substituição de

grupos aromáticos na posição 4- da cadeia do ácido butírico mantém ou até mesmo favorece esta atividade inibitória. Estes resultados evidenciam, portanto, a importância do volume molecular e da polaridade dos ácidos carbônicos de cadeia curta no mecanismo de inibição da HDAC. Estes estudos concordam com os resultados obtidos neste trabalho.

Capítulo 11

Os Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (NSAID)

Os anti-inflamatórios não-esteroidais estão entre os os agentes terapêuticos mais largamente usados. Eles pertencem a diferentes classes de compostos químicos. A maioria destas drogas tem três tipos de efeitos principais:

- *Efeito anti-inflamatório*: modificação da reação inflamatória;
- *Efeito analgésico*: redução de certos tipos de dor;
- *Efeitos anti-piréticos*: redução de temperatura corporal.

Em geral, todos estes efeitos estão relacionados à ação primária das drogas – inibição da ciclo-oxigenase (COX) e, portanto, inibição da produção de prostaglandina e tromboxanos (Figura 49).

Há dois tipos de ciclo-oxigenase nominalmente COX-1 e COX-2. Estas enzimas também são chamadas “prostaglandina H₂ Sintetase (PGHS)1 e 2”. A COX-1 é uma enzima constitutiva expressa na maioria dos tecidos, incluindo plaquetas e está envolvida em sinalização célula-célula e na homeostase de tecidos. A COX-2 é induzida nas células inflamatórias quando estas estão ativadas e acredita-se que sejam enzimas que produzem os mediadores prostanóides do processo inflamatório. A maioria dos NSAIDs inibe ambas as enzimas em diferentes graus.

O principal mecanismo de ação dos NSAIDs é a *inibição da enzima araquidonato ciclo-oxigenase*.

A ciclo-oxigenase é uma enzima bi-funcional, tendo duas atividades distintas - a principal atividade da COX é a produção de PGG₂ e uma atividade peroxidase que converte PGG₂ e PGH₂. Diferentes NSAIDs podem inibir a enzima por diferentes vias, mas todos agem no primeiro dos dois sítios. ¹¹¹

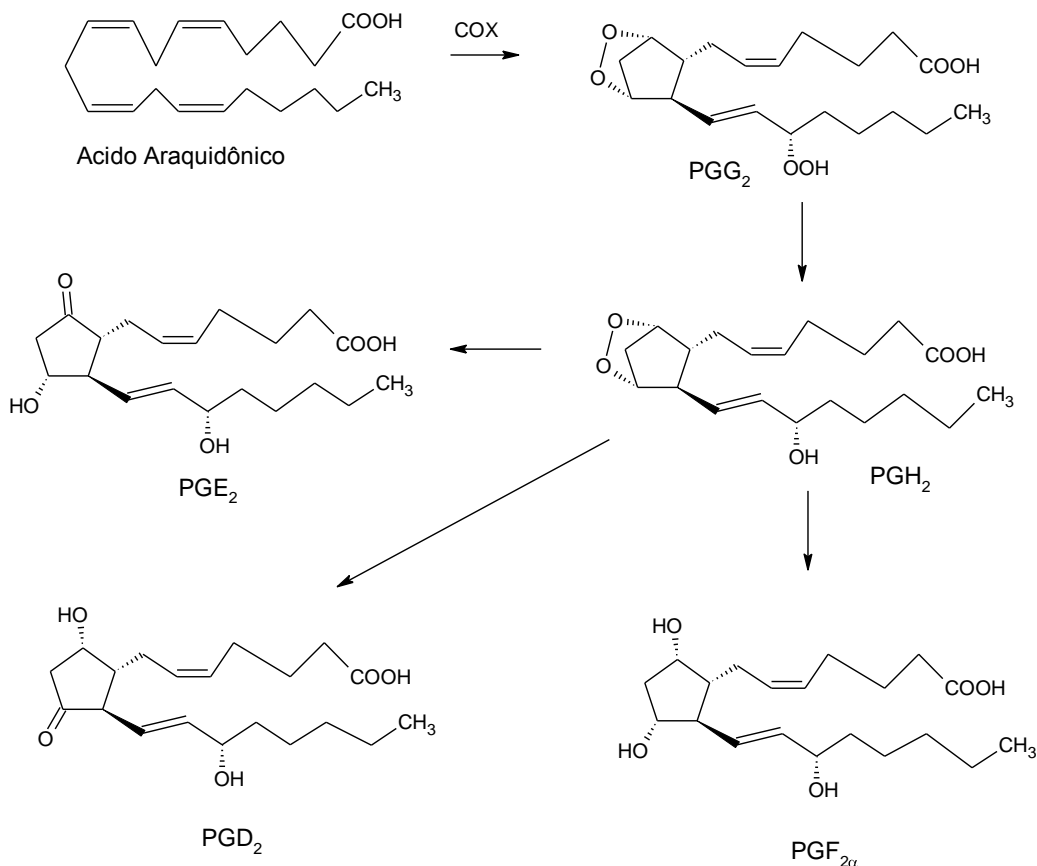


Figura 49 Esquema da Biossíntese de Prostaglandinas

O ácido acetil-salicílico, AAS, (“aspirina”), um dos mais amplamente utilizado NSAIDs, inibi a COX de maneira irreversível. Este medicamento acetila o aminoácido serina 530 que está no vértice do longo canal da enzima e, portanto, exclui o araquidonato do canal. O ácido acetil salicílico é o único inibidor da COX que causa modificação covalente desta enzima, e, por isso, esta modificação é irreversível. A recuperação da atividade enzimática depende da síntese de novas enzimas.

O mecanismo de ação do ácido-acetilsalicílico foi determinado experimentalmente por marcação isotópica. Quando microssomos de vesículas seminais de carneiro foram tratadas com AAS tritiado na metila do grupo acetil, a acetilação da enzima foi observada. No mesmo experimento realizado com AAS tritiada no anel aromático não se observou incorporação do trítio, sugerindo que a acetilação não ocorrera. Assim o mecanismo mais aceito para a

atividade do ácido acetil-salicílico é a transesterificação do AAS, conforme demonstrado na Figura 50. ²

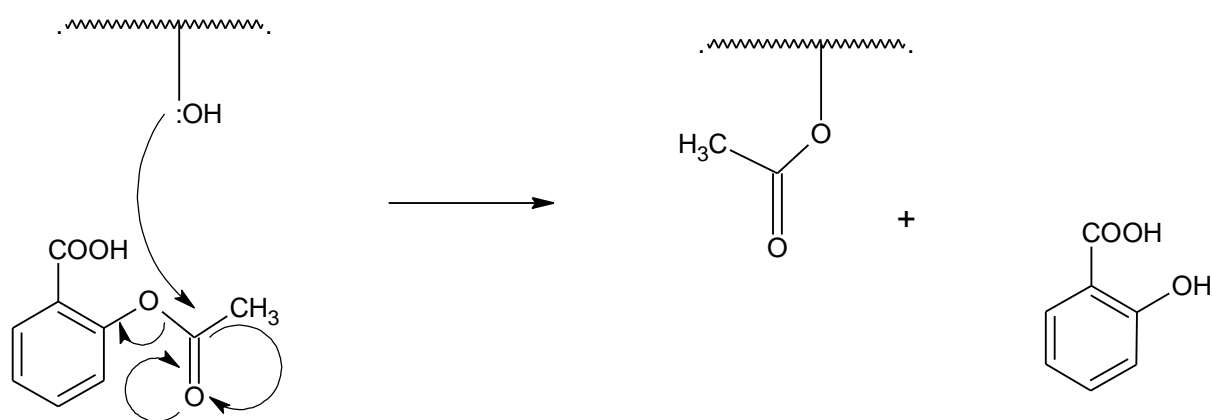


Figura 50 Mecanismos de acetilação da COX pelo ácido acetil salicílico

O acetoaminofenol (“paracetamol”) é um NSAID com fraca atividade sobre as enzimas COX-1 e COX-2. Esta droga tem atividade analgésica e antipirética, mas apenas um fraco efeito antiinflamatório, possivelmente devido à sua seletividade por uma isoenzima específica do sistema nervoso. Com doses terapêuticas normais, o acetoaminofenol é metabolizado por vias apresentadas na Figura 51. Entretanto, em altas doses, o metabolismo do acetoaminofenol segue caminhos distintos os quais podem reduzir os níveis de glutatona e gerar intermediários tóxicos havendo danos celulares.

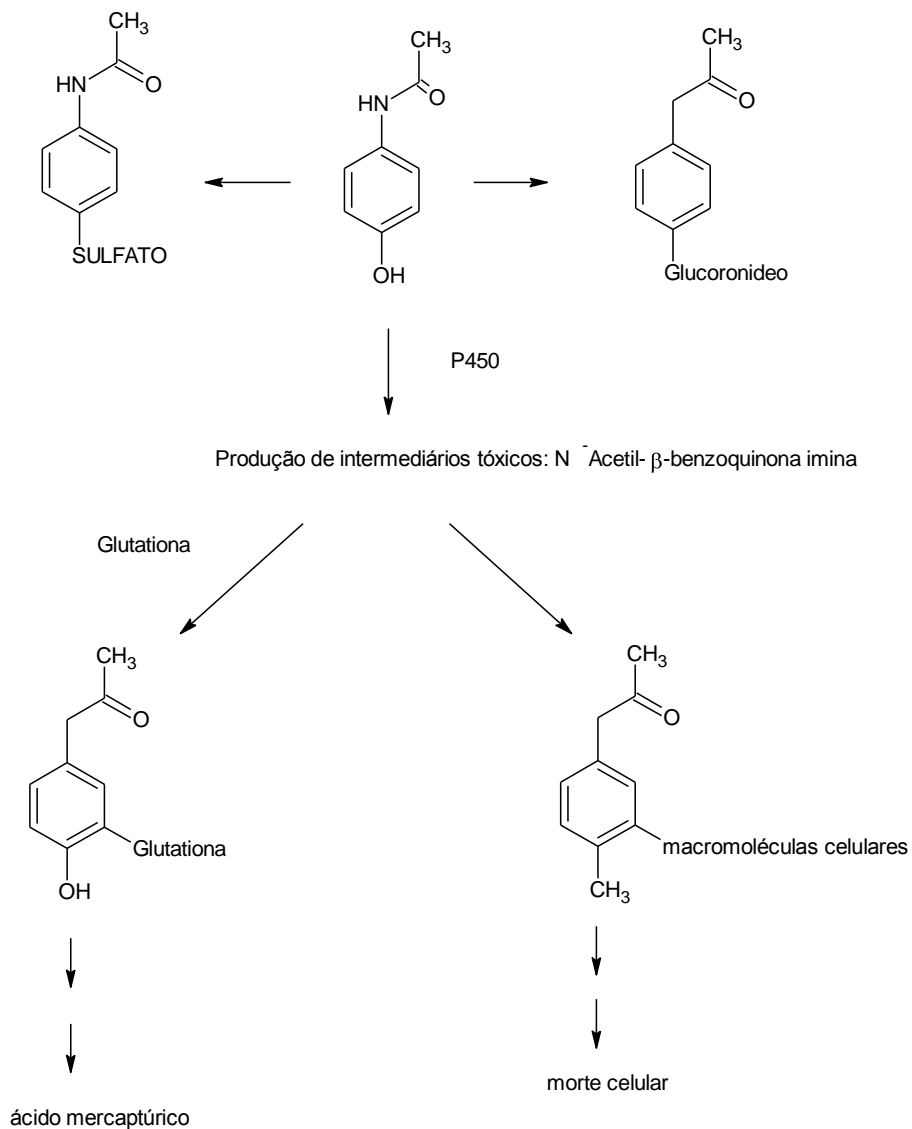


Figura 51 Metabolismo do acetaminofenol

11.1 A Biossíntese de Prostaglandinas e o *Trypanosoma cruzi*

A descoberta de que protozoários parasíticos como o *T. cruzi* possuem a maquinaria enzimática para a biossíntese de prostaglandinas (PGs) levou a uma mudança de paradigma com respeito ao papel das PGs durante a infecção. As infecções com o *T. cruzi* causam uma rápida imunossupressão durante a fase aguda e uma elevada síntese de PGE₂. Devido à PGE₂ ser um potente imunomodulador, este composto poderia estar envolvido na imunossupressão observada durante a infecção com o *T. cruzi*. Embora se saiba que o *T.*

cruzi é capaz de gerar PGs a partir de ácido araquidônico e de PGH₂, as tentativas de se identificar uma enzima equivalente à COX dos metazoários tem se mostrado infrutífera até o momento. A incapacidade de inibidores de COX de coibir a produção de PGs nestes microorganismos é uma evidência adicional de que os mecanismos de síntese de PGs dos protozoários são distintos daquele observado em células de mamíferos.¹¹²

Alguns resultados sugerem que a combinação de NSAID com a quimioterapia da doença de Chagas possa ser bastante efetiva no combate à parasitemia. Um recém-publicado estudo demonstrou que a combinação de ácido acetil-salicílico com Nifurtimox ou Benzonidazol reduziu significativamente o crescimento *in vitro* de *T. cruzi* aparentemente devido ao re-estabelecimento da resposta anti-parasítica dos macrófagos resultante da recuperação dos níveis de óxido nítrico promovidos pelo AAS.¹¹³

11.2 Medicamentos Híbridos

Os medicamentos híbridos (“drogas híbridas”) são uma nova forma de abordagem na pesquisa por medicamentos que constitui a síntese de moléculas que contém dois princípios ativos em uma única molécula com o propósito de potencializar as atividades e/ou de compensar os efeitos colaterais dos medicamentos associados.¹¹⁴

O avanço nesta linha de pesquisa levou ao desenvolvimento de uma série de estratégias incluindo o desenvolvimento de protocolos de varredura para identificação de diferentes enzimas-alvos para inibidores através de simulação computacional. Esta abordagem se mostrou promissora em patologias como a Síndrome Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) na qual atualmente se utiliza uma quimioterapia com diferentes alvos e a malária.¹¹⁵ Combinações bem sucedidas também foram obtidas com NSAIDs e inibidores de lipo-oxigenase para combate ao processo inflamatório¹¹⁶. NSAID combinados à grupos químicos que liberam NO também se mostraram bastante eficazes no combate a certos tipos de neoplasias.¹¹⁷

Nesta etapa do trabalho, pretende-se investigar a possibilidade de síntese e avaliação de medicamentos híbridos formados por Inibidores de Histona Deacetilase (HDACi) e Inibidores Não-Esteroidais da Síntese de Prostaglandinas (NSAID). A combinação de dois potenciais inibidores do protozoário *T. cruzi* em uma mesma molécula é uma via potencial

para a descoberta de um inibidor eficaz do crescimento do protozoário. Alternativamente, vamos abordar a combinação física de princípios ativos distintos em microemulsões com o propósito de obter um aumento de atividade tripanocida.

11.3 Metodologia

- a) **Síntese do Ácido Butil-Salicílico:** Para a síntese do ácido butil-salicílico adicionou-se 1,38 g de ácido salicílico em 20 mL de tolueno. Acrescentou-se mais 1,2 mL de anidrido butírico e 0,2369 g de ácido p-tolueno sulfônico (catalisador). A mistura foi posta em refluxo 2 horas. Após este período o produto foi resfriado e solvente removido no rota-evaporador. O produto foi purificado por cromatografia em coluna e caracterizado por ressonância magnética nuclear de próton e de carbono (RMN- H^1). (anexo.1)

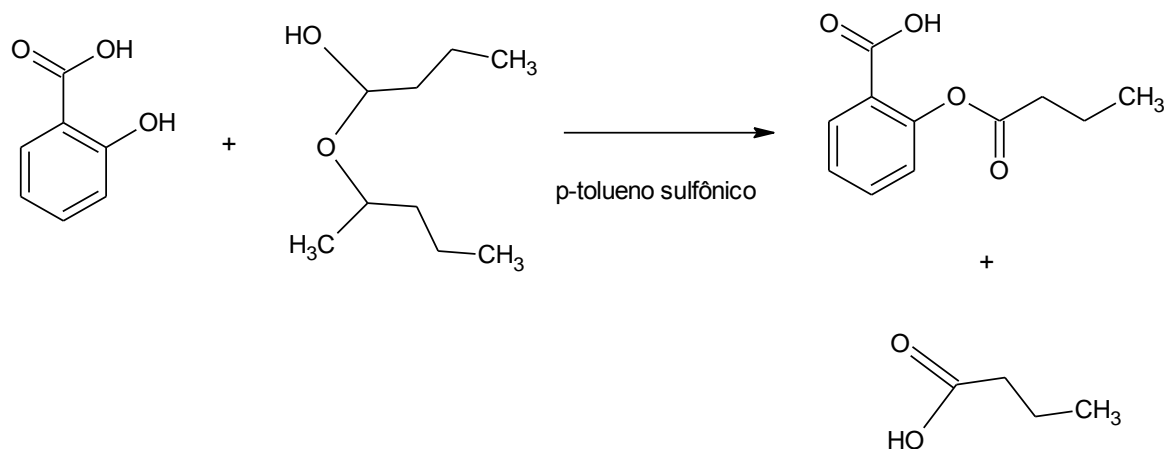


Figura 52 Síntese do ácido butil salicílico

- b) **Síntese da tributirina:** Uma mistura equimolar de glicerol e anidrido butírico foi posta em agitação e adicionou-se a esta mistura algumas gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). O sistema foi mantido sob agitação constante por 15 minutos (observa-se a liberação de calor pelo meio reacional). Após este período de tempo, a agitação foi suspensa e o produto foi vertido sob uma solução saturada de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$). O

produto foi seco com Na_2SO_4 anidro e caracterizado por Ressonância Magnética Nuclear do próton (RMN- H^1). (anexo 2)

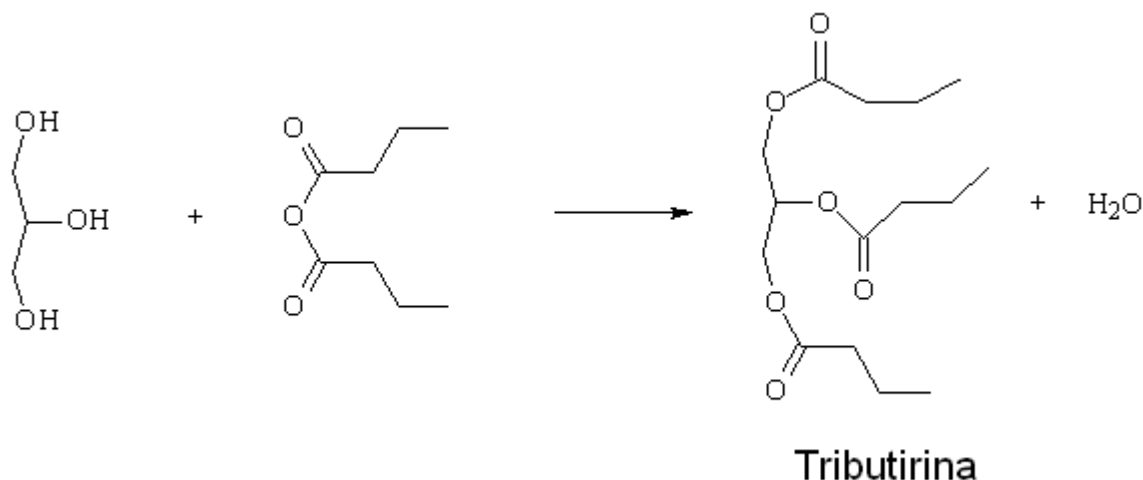


Figura 53 Síntese de Tributirina

c) Preparação das micro-emulsões:

As micro-emulsões foram preparadas pelo procedimento geral:

Misturou-se 0,5 de solução tampão-fosfato (pH = 7,4); 6,7 mL de etanol (70%); 3,1 mL de polissorbato (Tween 80%); 1,5 mL do composto ativo (tributirina, solução de ácido acetil-salicílico em tributirina, solução de acetoamino fenol em tributirina, solução aquosa de acetoaminofenol e solução aquosa de ácido acetil-salicílico). No caso da amostra considerada como o branco, o composto ativo foi substituído pela solução tampão. A mistura é posta em agitação por 15 min. e caracterizada quanto pela medida de sua condutividade e por centrifugação. A condutividade das soluções variou entre 212 e 424 μS e quando centrifugadas a 2.000 rpm não houve separação de fases.¹¹⁸

11.4 Resultados

11.4.1 RMN-H¹ (ácido butil-salicílico)

O espectro apresenta um sinal tripleto em campo alto próximo a $\delta = 1,0$ referente à metila do grupo butil, um sinal na forma aproximada de um sexteto originado do metileno (-CH₂-) da cadeia do grupo butil $\delta \cong 1,9$ e mais um sinal tripleto do segundo metileno (-CH₂-) também em campo alto $\delta \cong 2,6$. Observa-se um multipeto típico de hidrogênios ligados ao anel aromático com deslocamento entre $\delta \cong 7$ e $\delta \cong 8$ referente aos hidrogênios do anel aromático do ácido salicílico e um singlete em campo baixo com deslocamento $\delta \cong 12$ referente ao hidrogênio da carboxila. (Anexo.1)

O espectro de ressonância magnética do próton (RMN-H¹) do produto revelou o sinal tripleto em campo alto ($\delta \cong 1,0$ ppm, com integração igual a 3) da metila terminal da cadeia do ácido butírico. Também observa-se um sexteto decorrente do metileno da cadeia do ácido butírico em campo alto ($\delta \cong 1,8$ ppm, integração de 2,32) e um sinal tripleto em campo alto mas menos blindado ($\delta \cong 2,6$ ppm, integração igual a 2,35) resultante dos hidrogênios do carbono alfa da cadeia do ácido butírico. O sinal em campo baixo ($\delta \cong 7$ ppm) são causados pelos hidrogênios do anel aromático e o singlete em campo baixo ($\delta \cong 12$ ppm) é causado pelo hidrogênio do ácido salicílico. A intensidade dos sinais no produto bruto sugere que há grande quantidade de ácido butírico no produto.

Tributirina

Por ser uma molécula com muitos prótons em ambientes similares, o espectro de RMN-H¹ da tributirina mostra sinais fortes, especialmente os de campo alto. Os hidrogênios da metila terminal das três cadeias de ácido butírico no éster tributirina aparecem como um sinal tripleto em campo alto (δ abaixo de 1 ppm) indicando a elevada blindagem destes prótons. Os grupos metilenos como um sinal multipeto na cadeia carbônica do ácido butírico aparecem um pouco acima de $\delta \cong 1,5$ ppm. Os metilenos vicinais aos grupos ésteres

aparecem como um tripleto mais desblindado com deslocamento pouco abaixo de $\delta \cong 2,4$ ppm. Os metilenos na cadeia do glicerol aparecem em campo baixo como um duplo dubleto ($\delta \cong 4,0$ ppm – 4,4 ppm) devido aos estes dois grupos serem vizinhos ao hidrogênio ligado ao carbono central na cadeia do glicerol. Este último próton mostra um quinteto em campo baixo, (δ acima de $\cong 5,2$ ppm). Os sinais são, portanto, compatíveis com a estrutura da tributirina. (Anexo.2)

11.4.2 Resultados da atividade *in vitro*

Os inibidores não-esteroidais da ciclooxigenase não apresentam atividade tripanocida detectável pelo método do ensaio MTT. O ácido butilsalicílico bruto também não mostrou atividade tripanocida neste ensaio.

Para investigar a importância do grupo acetato do ácido acetilsalicílico na atividade destes compostos sobre o *T. cruzi*, preparamos micro-emulsões dos mesmos contendo os princípios ativos investigados, ou seja, acetoaminofenol (paracetamol), tributirina e ácido acetil-salicílico. Tanto nos testes nas formas epimastigota livres como nas formas amastigota intracelular do *T. cruzi*, não se observou atividade das micro-emulsões nas concentrações testadas. Na Figura 54 alguns dos resultados são demonstrados. Não se observa diferenças significativas entre o branco e as amostras tratadas.

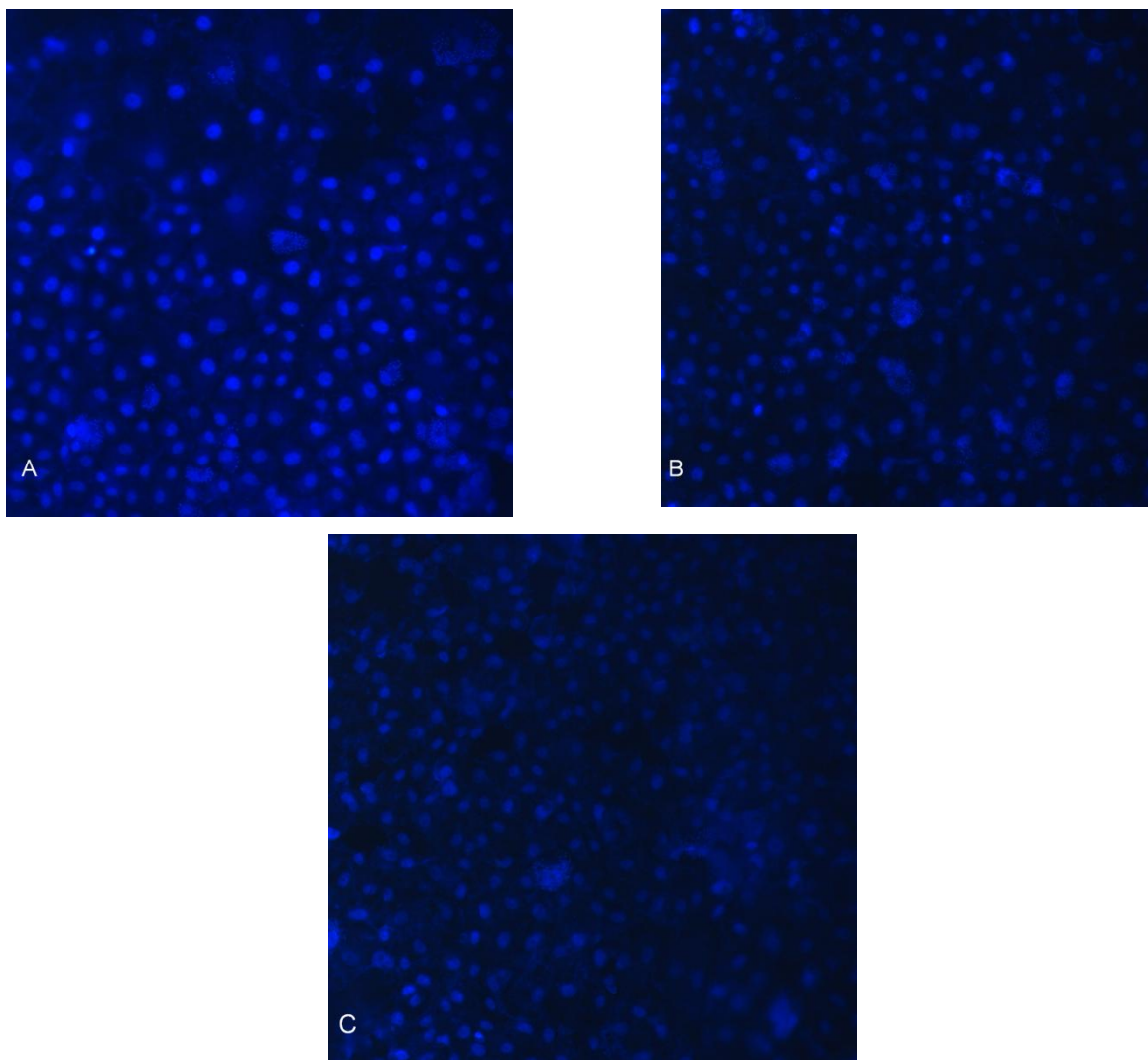


Figura 54 Resultado das atividades das microemulsões. Em A) imagens da microscopia CONFOCAL do “branco”, em B) Tributirina e em C) tributirina com AAS.

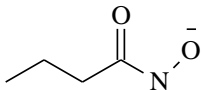
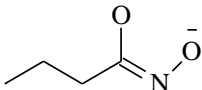
Os resultados apresentados na figura 54 demonstram a inatividade das microemulsões de tributirina com inibidores da COX. Este resultado parece se contrário a alguns outros relatados na literatura que mostram a atividade de alguns inibidores da COX (como o ácido acetil-salicílico) contra o *T.cruzi*. Esta diferença pode ser oriunda do efeito antagônico do inibidor de histona deacetilase ou, alternativamente, possa ser decorrente da atividade metabólica da célula hospedeira. Não há dados suficientes para definir com clareza quais as possíveis explicações da ausência de atividade destas micro-emulsões.

Capítulo 12

Avaliação dos compostos hidroxâmicos

Os ácidos hidroxâmicos constituem um dos principais inibidores da enzima histona deacetilase. Pretendemos aqui avaliar a interação do ácido butilhidroxâmico – o análogo hidroxâmico do ácido butírico. Inicialmente, realizamos o cálculo de dinâmica estocástica com mecânica clássica (ver capítulo de metodologia) deste ácido com a estrutura da HDAC obtendo os valores descritos na Tabela 9.

Tabela 9 Energia de interação dos análogos hidroxâmicos calculados por dinâmica estocástica

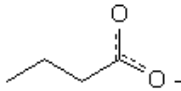
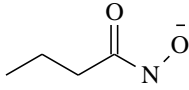
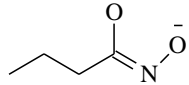
Espécie Química	Tipo de interação	
Ácido butilhidroxâmico	Interação eletrostática (kcal/mol)	Interação de Van der Waals (kcal/mol)
Isômero ceto 	466,76	28,54
Isômero iminol 	518,42	25,30

Os valores de energia de interação eletrostática calculados por dinâmica estocástica indicam uma baixa energia de interação dos análogos hidroxâmicos do ácido butírico com a enzima HDAC. Este resultado pode ser devido à descrição insuficiente da parametrização para o grupo ácido hidroxâmico. Os cálculos **ab initio** indicam uma forte contribuição covalente (diferença de energia entre os orbitais de fronteira, apresentados na Tabela 13) participa do mecanismo de interação entre o grupo ácido hidroxâmico e o núcleo metálico da enzima. O modelo parametrizado não descreve bem esta espécie química.

A geometria obtida com a simulação do complexo metal-ligante é demonstrada na Figura 55. A formação de complexo entre um ligante e um metal depende da capacidade de formação de uma ligação covalente entre as espécies químicas. Uma forma de avaliar a

capacidade de formação do complexo é viabilidade de haver sobreposição de orbitais, o que é favorecido quando há aproximação entre os orbitais de fronteira HOMO (da espécie química aniônica) e LUMO da espécie química catiônica. Os resultados dos cálculos são revelados na Tabela 10.

Tabela 10. Comparação entre a energia do HOMO e LUMO dos inibidores e do cátion de zinco

Espécie Química	Diferença de energia na entre os orbitais HOMO e LUMO (Zn ²⁺)
Butirato (espécie química de referência) 	0,262 hartree
Ácido butilhidroxâmico (isômero ceto) 	0,181 hartree
Ácido butilhidroxâmico (isômero iminol) 	0,189 hartree

O análogo hidroxâmico do ácido butírico (tanto em seu isômero ceto quanto em seu isômero iminol) apresenta menor diferença de energia entre o seu orbital HOMO e o orbital LUMO do íon Zn²⁺. A presença do átomo de nitrogênio na base conjugada do ácido hidroxâmico (o “hidroxamato”) faz com que a energia dos orbitais HOMO desta espécie química seja maior do que no ácido carboxílico reduzindo a diferença de energia em relação ao íon metálico. Isso revela uma característica importante do mecanismo de inibição da histona deacetilase: embora os ácidos hidroxâmicos tenha uma tendência a formar complexos com o íon de zinco devido à pequena diferença de energia, o mesmo não ocorre com o ácido carboxílico o que sugere que o mecanismo de inibição promovido pelo ácido butírico envolva outros fatores além da quelação.

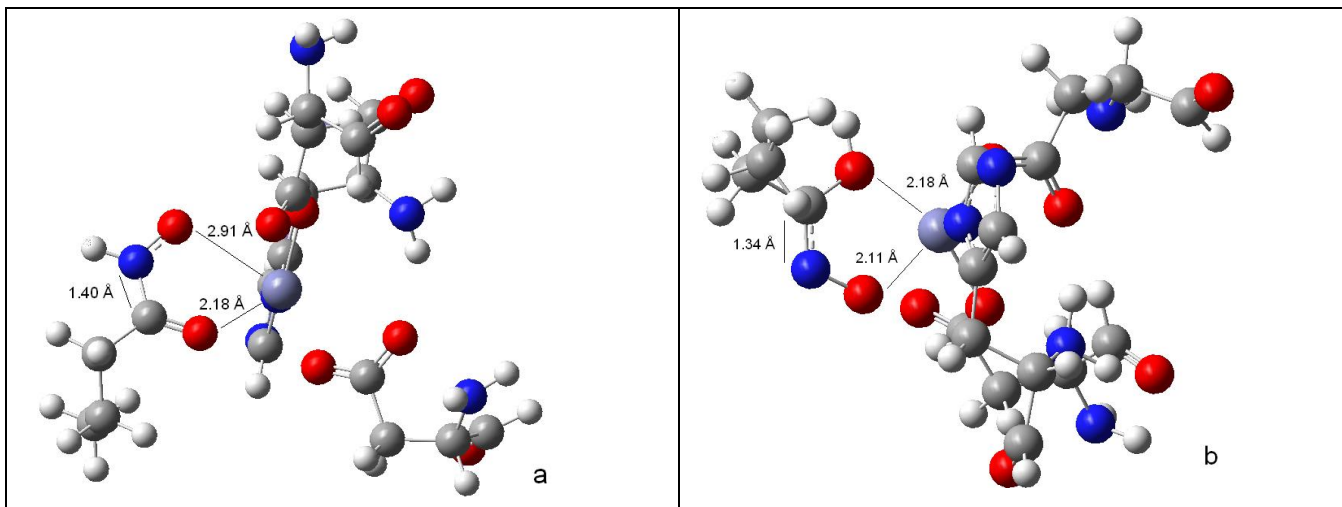


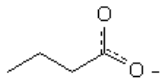
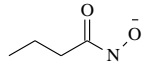
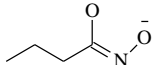
Figura 55 Geometrias finais da otimização de geometria dos compostos hidroxâmicos. Em a) isômero ceto e em b) isômero iminol do ácido butilhidroxâmico.

As duas espécies químicas carregadas (cátions e ânions) terão interação resultante da forças eletrostáticas atuantes. A formação do complexo, portanto, dependerá do percentual caráter iônico desta ligação inibidor-metal. Tradicionalmente, utiliza-se a relação:

$$\text{Porcentagem de caráter iônico} = 100 \left[1 - e^{-\frac{(\Delta EN)^2}{4}} \right]$$

Onde ΔEN corresponde à diferença de eletronegatividade dos átomos envolvidos na ligação. Uma diferença de eletronegatividade igual ou superior a 1,7 (o que corresponderia por esta relação a um percentual de caráter iônico de 51,45%) é considerada iônica. Para a interação entre as espécies química avaliadas, entretanto, esta abordagem é insatisfatória, tanto pelo número de átomos envolvidos como também por desconsiderar a perturbação na nuvem eletrônica causada pelos grupos presentes nas moléculas. Assim, consideramos mais prudente avaliar o caráter iônico e/ou covalente da ligação pela transferência de carga. Esta abordagem permite uma avaliação mais exata de um sistema envolvendo mais do que dois átomos e viabiliza o estudo do comportamento da nuvem eletrônica do complexo. Quando realizamos cálculos de carga ChelpG para a interação ácido butírico íon de zinco (Zn^{2+}), observamos uma transferência de carga do carboxilato para o íon metálico. (Tabela 11)

Tabela 11. Valores de energia dos orbitais de Fronteira HOMO e LUMO.

Espécie química	Carga ânion	Carga cátion (Zn ²⁺)	Energia total (Hartree)
Ácido butírico 	- 0,811158	1,811160	-2086,11578
Ácido butilhidroxâmico (isômero ceto) 	- 0,754019	1,754020	-2141,45886
Ácido Butilhidroxâmico (isômero iminol) 	-0,678597	1,678600	-2141,45321

Como pode ser visto nos valores apresentados na Tabela 11, esta transferência de carga é bem mais efetiva no isômero iminol do que no isômero ceto do ácido hidroxâmico o que poderia indicar que este isômero seria a forma predominante responsável pela atividade inibitória observada nos ácidos hidroxâmicos. A energia total dos *isômeros* revela que o complexo hidroxamato-cátion metálico possui uma estabilidade parecida tanto na forma ceto quanto na iminol. Aparentemente, a transferência de carga do ânion para cátion Zn²⁺ estabiliza o isômero iminol.

Os valores de distância de ligação indicam que o ácido hidroxâmico tem uma interação mais favorecida com o cátion Zn²⁺ em solução aquosa do que o ácido butírico (Figura 56).

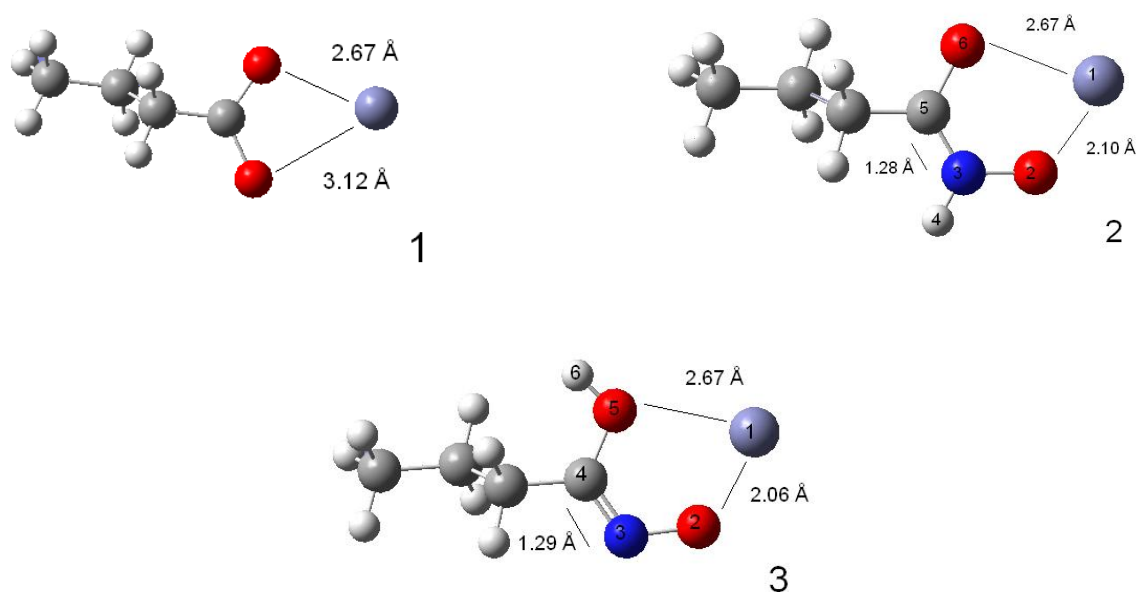


Figura 56 Geometria otimizada dos inibidores com Zn^{2+} (em solvente). Em 1 ácido butírico, em 2 ácido hidroxâmico (isômero ceto), em 3 ácido hidroxâmico (isômero iminol).

Os valores de distância de ligação nas duas formas isoméricas do ácido hidroxâmico também indicam que os isômeros são equivalentes em termos de energia. O comprimento da ligação carbono-nitrogênio, por exemplo, tem praticamente o mesmo valor nos dois casos. Dada a baixa diferença de energia entre os dois isômeros na presença do íon Zn^{2+} é provável que haja uma conversão entre as duas formas.

12.1 Síntese dos compostos Hidroxâmicos

O ácido butil-hidroxâmico foi sintetizado a partir do éster tributirina. O procedimento padrão foi: adicionou-se em 30,0 mL de tributirina (Tributilglicerol, cerca de 0,1 mol) 310 mL de solução etanólica (etanol 70%) de hidroxilamina ($NH_2OH.HCl$, 1 mol/L, cerca de 0,31 mol) sob agitação constante e 66 mL de solução de hidróxido de sódio (20%). A mistura foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente por aproximadamente 6 horas e permaneceu estocada por mais 48 horas.

Nas sínteses dos complexos-metal ácido hidroxâmico, o procedimento seguido foi o mesmo, sendo que as quantidades utilizadas foram de 5 mL de tributirina, 1,0 mL de solução

etanólica de hidroxilamina, 0,2 ml de solução de NaOH (20%). Após esta etapa, o hidroxamato era convertido em ácido pela adição de 1,0 mL de HCl (2 M). A fração aquosa foi separada do glicerol e adicionou-se a quantidade apropriada das soluções aquosas de Cloreto Férrico (FeCl_3) e sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Os complexos foram caracterizados por espectroscopia UV-Visível, espectrofotômetro HACH. Não foram executados os ensaios *in vitro*.

Capítulo 13

Estudos sobre a Nevirapina

13.1 Avaliação da atividade tripanocida

Avaliamos alguns fármacos com possível atividade tripanocida. Os Inibidores Não-Nucleosídicos da Transcriptase Reversa (INNTRs) são um grupo estruturalmente diverso que, ao contrário dos INTRs, inibem de maneira alostérica a TR, ligando-se a uma cavidade hidrofóbica que dista cerca de 10 Å do sítio ativo da enzima, na subunidade p66 da TR HIV-1. O mecanismo de inibição parece estar associado a um reposicionamento de resíduos da cavidade ligante dos INNTRs que causa uma distorção nos resíduos do sítio ativo da TR.¹²⁰ A elevada especificidade dos INNTRs à TR os torna relativamente pouco tóxicos aos pacientes¹²¹. Merluzzi e colaboradores¹²² investigando a atividade de dipiridodiazepinonas como antagonistas dos receptores muscarínicos, identificaram um potente inibidor da transcriptase reversa do HIV-1, a 11-ciclopropil-5,11-11-diidro-4-metil-6H-dipirido[3,2-12b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-ona, mais tarde chamada de nevirapina (Figura 57). A nevirapina é amplamente utilizada na profilaxia da transmissão materno-infantil do HIV-1.¹²³

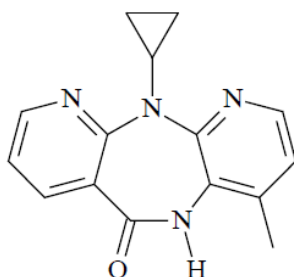


Figura 57 Estrutura da nevirapina

Alguns pesquisadores têm proposto seu uso na terapia anti-retroviral altamente ativa em adultos¹²⁴. A nevirapina é ministrada em uma única dose diária de 200mg nos primeiros 14 dias, aumentando-se então para 400mg por dia¹²⁵. Embora tenha uma toxicidade não

desprezível (hepatotoxicidade já bem descrita com possíveis casos fatais),¹²⁶ é considerada menos tóxica do que inibidores nucleosídicos da Transcriptase Reversa como o AZT e 3TC.

A hepatotoxicidade da nevirapina tem sido atribuída à capacidade deste medicamento de inibir a ADN polimerase mitocondrial. Tendo em vista este efeito colateral, investigou-se este medicamento como um possível inibidor da ADN polimerase mitocondrial de dois protozoários: o *T. cruzi* e a *Leishmania chagasi*. Em ambos os casos, foram testadas as formas epimastigota (Figura 58). Não se observou efeito sobre as células dos protozoários nesta forma, como pode ser visto nas imagens abaixo.

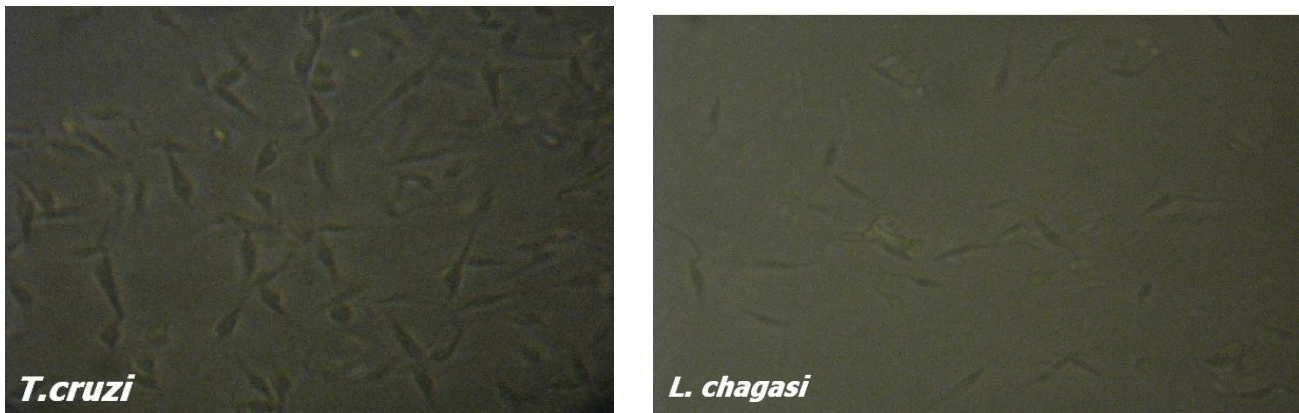


Figura 58 Culturas de *T. cruzi* e *L. chagasi* nas formas epimastigota contendo nevirapina no meio. Mesmo em elevada concentração (1mM) não se observa atividade do composto sobre os parasitas.

Entretanto, o teste foi repetido com células L6 infectadas com *T. cruzi* na quantidade aproximadamente 10 parasitas por células revelando uma atividade significativa sobre o parasita nestas condições. Na Figura 59 é possível observar este resultado. Na Figura 60, um gráfico da contagem de parasitas intracelulares é demonstrado. É possível observar que neste teste, a nevirapina mostra uma toxicidade sobre o *T. cruzi* à partir de uma concentração de 40 $\mu\text{mol/L}$.

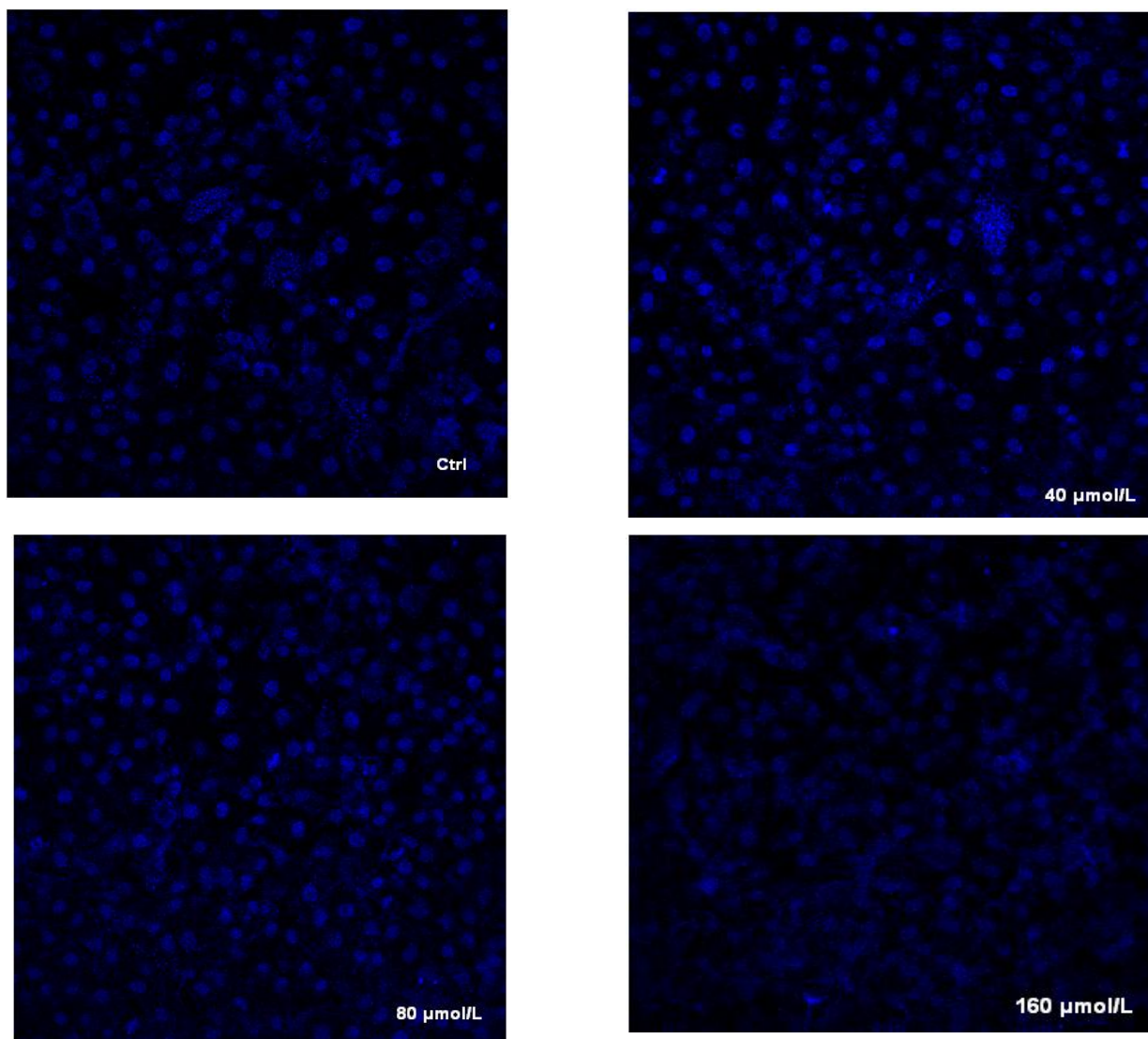


Figura 59 Imagens da microscopia CONFOCAL de células L6 infectadas com *T. cruzi* com diferentes concentrações de nevirapina. O aumento na concentração de nevirapina causa uma redução na quantidade de parasitas intracelulares. Em altas concentrações (160 μ M) há mudança na morfologia da célula indicando o efeito tóxico da nevirapina sobre as células L6

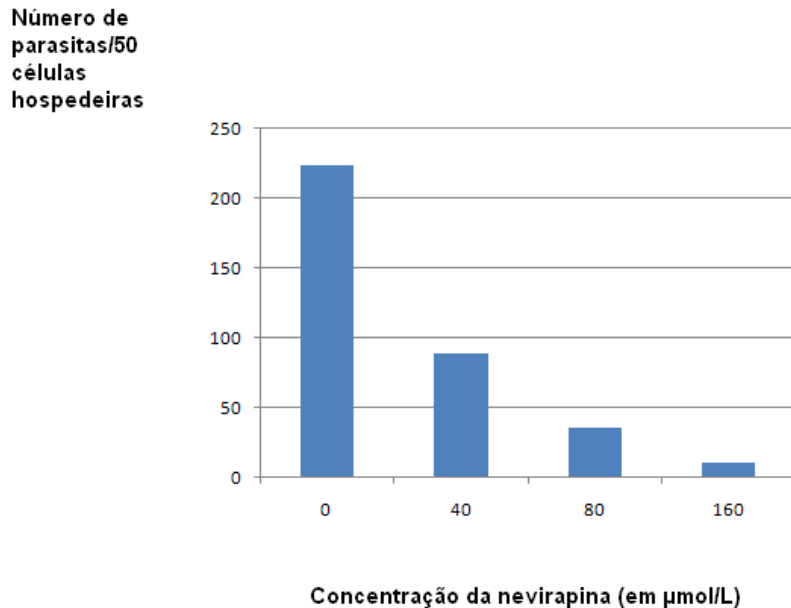


Figura 60 Contagem de número de parasitas intracelulares

Este resultado é curioso visto que na forma epimastigota livre (resultado anterior, Figura 58), o *T. cruzi* é capaz de concentrações bastante elevadas (da ordem de 1,0 mmol/L) enquanto que na forma amastigota se torna sensível a doses muito inferiores (de cerca de 40-80 $\mu\text{mol/L}$) de nevirapina. É importante destacar que as imagens da microscopia confocal não permitem uma quantificação precisa da atividade tripanocida embora seja possível afirmar que há uma redução dose-dependente na quantidade de parasitas intracelulares. Uma possível causa desta diferença de atividade observada nos dois casos é a forma do parasita nos dois casos. No primeiro teste, o *T. cruzi* encontra-se na forma epimastigota, uma forma flagelada com morfologia e proteínas de membrana específicas. No segundo teste, o *T. cruzi* encontra-se a forma amastigota, uma forma sem flagelo, com morfologia aproximadamente esférica e com proteínas de membrana diferentes daquela encontrada na forma epimastigota. Visto que a nevirapina inibe a transcriptase reversa no HIV-1 é razoável supor que este composto esteja inibindo alguma ADN polimerase do *T. cruzi* e esta seja a causa do efeito tóxico. Há, entretanto, muitos pontos a se investigar nesta atividade. Visto que o *T. cruzi* possui como uma de suas vias metabólicas para detoxificação a oxidação de moléculas. A oxidação de nevirapina pela enzima P450, por exemplo, pode gerar metabólitos

tóxicos hidrossolúveis ¹²⁷. De fato, dois metabólitos da nevirapina são conhecidos por seus efeitos tóxicos, a 12-hidroxicinevirapina e a nevirapina metídeo quinona (Figura 61).

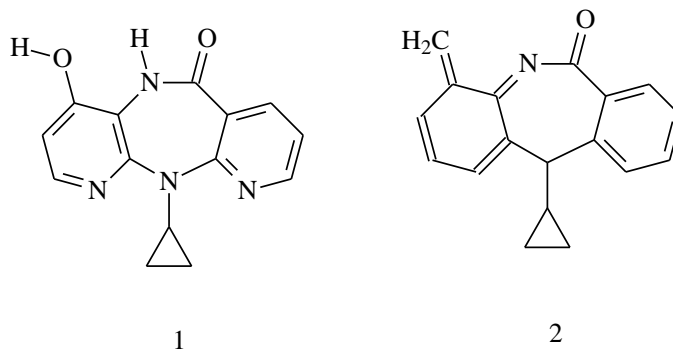


Figura 61 1= estrutura da 12-hidroxicinevirapina, 2 = estrutura da nevirapina metídeo quinona

Alguns metabólitos da nevirapina podem efetivamente formar adutos com o ADN (ou seja ligar-se covalentemente com bionucleófilos). Uma outra possibilidade seria que a nevirapina estivesse inibindo a histona deacetilase, visto que este composto é um amida e, portanto, poderia mimetizar o substrato natural desta enzima. Procedemos uma combinação de métodos de mecânica molecular com cálculo **ab initio**, isto é, uma pré-otimização da geometria da enzima (código 1T67, P.D.B.) complexada com a nevirapina seguida por uma otimização **ab initio** da geometria resultante. Os cálculos resultados revelaram uma energia de interação significativa de aproximadamente 49,6 Kcal/mol. Este sistema, portanto, não deve ser favorável e esta hipótese é pouco provável.

No início da década de 1990, Teixeira e co-autores publicaram resultados (inclusive patenteados) ¹²⁸ que sugeriam que algumas drogas usadas na terapia antirretroviral do HIV-1, especialmente os inibidores nucleosídicos e não-nucleosídicos de transcriptase reversa, reduziram a infecção do parasita *T. cruzi* em macrófagos quando combinados com drogas tripanocidas convencionais (benzonidazol e nifurtimox). Teixeira *et al* atribuíram os resultados observados à inibição da integração do genoma do parasita com o genoma do hospedeiro. Entretanto, estes resultados foram contestados como sendo produto de uma forma imprecisa de quantificar esta integração genoma-hospedeiro.

Com respeito aos pacientes co-infectados com HIV-1 e *T. cruzi*, tem sido demonstrado em vários estudos que a imunodepressão causada pela AIDS leva a uma re-emergência da

Doença de Chagas. Assim, a recomendação consensual é a de que o paciente co-infectado deve ser tratado com a terapia antirretroviral o que reduz significativamente o risco de reativação da Doença de Chagas.

Devido à importância destes resultados para o desenvolvimento futuro de um tratamento para a cardiomiopatia chagástica, requisitamos a proteção patentearia de uma proposta de composição farmacológica para tratamento desta patologia (REINPI-TO, protocolo nº 012/11, Anexo III)

13.2 Estudos *in silico* sobre a atividade de análogos da nevirapina contra a AIDS

Aspectos Gerais Sobre a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)

A definição da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) varia bastante na literatura. Uma boa definição é dada por Hutchinson: "A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, AIDS (mais conhecida no Brasil pela sigla em inglês, AIDS – Acquired Immune Deficiency Syndrome), é caracterizada pela progressiva perda de CD4+ auxiliares (helper)/indutoras(inducer) do subgrupo dos linfócitos T. A perda de células T leva a uma severa avaria da função imunológica, doenças constitucionais, infecções oportunistas, complicações neurológicas, (complexo AIDS demência) e neoplasma que raramente ocorrem em pessoas com a função imune intacta".¹²⁹ O mecanismo de avaria do sistema imunológico ainda é um tema controverso. Alguns trabalhos sugerem que os mecanismos de danos ao sistema imunológico, ativação do genoma proviral e de "escape" à resposta imunológica do hospedeiro pelo vírus são bastante complexos envolvendo inclusive interações com o sistema complemento¹³⁰.

O número de pessoas vivendo com o vírus da imunodeficiência humana em 2005 era estimado em 40,7 milhões de pessoas. Neste mesmo ano, cinco milhões de pessoas morreram em decorrência de problemas relacionados à AIDS. Embora tenha havido diminuição na taxa de infecção de adultos jovens em alguns países do Caribe e África, a tendência global ainda era de aumento. De fato, houve crescimento no número de 8

infecções no leste europeu, sudeste asiático sendo que a África sub-saariana continua a ser a região mais afetada.¹³¹

No Brasil, estima-se que existam cerca 620.000 pessoas vivendo com o HIV¹³². Autoridades sustentam que o acesso universal à terapia anti-retroviral pode se tornar inviável dentro dos próximos anos. O custo médio de cada paciente soropositivo para o governo em 2005 foi de R\$ 6.000,00. Com o crescimento da procura pelo tratamento, o custo total para o Ministério da Saúde pode se tornar proibitivo dentro dos próximos anos¹³³.

O VÍRUS

O Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) foi inicialmente isolado em 1983 de pacientes com AIDS. Estruturalmente, assemelha-se ao vírus linfotrópico humano tipo II e tipo III. Pesquisas conduzidas por diversos grupos demonstraram que o HIV é um membro da subfamília dos lentivírus pertencentes aos retrovírus humanos. Todos estes vírus codificam uma enzima ADN polimerase ARN dependente – a transcriptase reversa – que permite a transcrição do ARN viral numa cópia de ADN. Nesta forma, ele pode ser integrado ao genoma da célula hospedeira e se replicar através do ADN proviral. O genoma do HIV é composto de nove genes: o gene gag, que codifica proteínas do capsídeo do “core” viral, o gene pol, que codifica a transcriptase reversa, o gene env, que codifica proteínas do envelope viral, os genes tat, ver, nef, vif, vpr e vpx, que regulam a o ciclo de vida viral. O genoma do HIV também possui a Long Terminal Repeat (LTR) uma seqüência de ARN/ADN com função estrutural e regulatória.¹³⁴

Em 1987, Guyader e co-autores identificaram pacientes de Guiné-Bissau e de outros países do Oeste da África que demonstravam sintomas da AIDS, mas não apresentavam anticorpos contra o HIV. Os pesquisadores convencionaram chamar o vírus identificado nestes pacientes de HIV-2. ‘O alinhamento das seqüências de nucleotídeos do HIV-1 e HIV-2 demonstram que suas distâncias homológicas variam de ~60% para os genes mais conservados gag e pol, para 30-40% para outros genes virais e LTR’.¹³⁵

O HIV apresenta uma ampla variabilidade genética. A análise da distância genética entre alguns lentivírus primatas sugere que o HIV-1 e o HIV-2 originaram-se dos Vírus da Imunodeficiência Símia presente em chimpanzés (o HIV-1 parece descender de um lentivírus

primata presente na sub-espécie *Pan troglodytes troglodytes*) e em macacos Mangabeia (*Cercocebus atys*) (no qual está presente o provável ancestral lentivírus do HIV-2).¹³⁶

A Terapia Anti-retroviral Altamente Ativa

A replicação do HIV-1 compreende uma série de etapas, desde a adsorção do vírus à membrana celular até a maturação das partículas virais, passíveis de intervenção quimioterapêutica¹³⁹. Entre os medicamentos mais utilizados, os inibidores nucleosídicos (que inibem de maneira competitiva a síntese de ADN pela TR) e não nucleosídicos (que inibem de maneira não competitiva) da transcriptase reversa e os inibidores de protease se tornaram de singular importância na quimioterapia da AIDS. Os inibidores de protease, como o Indinavir, bloqueiam a atividade das proteases, enzimas que auxiliam na maturação e reprodução viral bem como ajudam a tornar o vírus infeccioso. Os inibidores da transcriptase reversa (TR) bloqueiam a enzima necessária ao HIV-1 na conversão do ARN viral em ADN.

137

Dada a elevada taxa de mutação do HIV-1, que confere a este vírus uma enorme capacidade de desenvolver resistência durante um tratamento com um inibidor, utiliza-se um coquetel de inibidores anti-retrovirais, isto é, uma combinação de remédios visando inviabilizar o desenvolvimento de resistência pelo HIV-1 uma vez que cada fármaco age em diferentes sítios de uma proteína viral e/ou diferentes proteínas virais. Esta terapia é conhecida como Terapia Anti-retroviral Altamente Ativa¹³⁸. Um típico “coquetel” é uma combinação tripla de inibidores de protease com os dois análogos nucleosídicos inibidores da transcriptase reversa (INTR), o AZT (zidovudina) e o 3TC (lamivudina)(Figura 62).¹⁴⁰

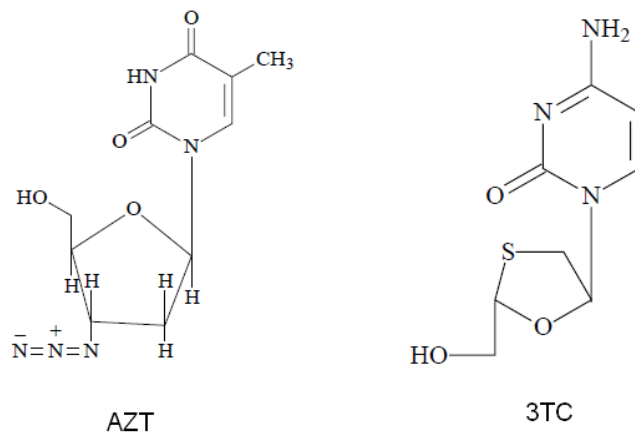


Figura 62 Estruturas do AZT e do 3TC

Embora seja capaz de suprimir o vírus, a suspensão da medicação causa um retorno na replicação das partículas virais. Além disso, há efeitos colaterais graves associados à administração da terapia por longos períodos de tempo, como os efeitos causados pelos INTR que vão desde esteatose hepática (“fígado gorduroso”) a acidemia láctica (potencialmente fatal), que parecem estar associados a danos nas mitocôndrias os resultados das pesquisas neste campo sugerem que os inibidores nucleosídicos inibem a replicação do genoma mitocondrial, afetando a produção das enzimas fundamentais para fosforilação oxidativa causando alterações na produção de ácido láctico. ¹⁴¹

A Transcriptase Reversa e os Inibidores Não-Nucleosídicos

O HIV é um retrovírus, o que significa que seu material genético é replicado numa seqüência inversa à da maioria dos seres vivos. A enzima responsável por esta capacidade é a transcriptase reversa (TR) que é uma enzima heterodimerica com dois pontos “isoeletricos” (pH=5,75 e pH=6,25) ¹⁴² capaz de replicar o ARN viral convertendo-o em uma fita dupla de ADN.

Os Inibidores Não-Nucleosídicos da Transcriptase Reversa (INNTRs) são um grupo estruturalmente diverso que, ao contrário dos INTRs, inibem de maneira alostérica a TR, ligando-se a uma cavidade hidrofóbica que dista cerca de 10 Å do sítio ativo da enzima, na subunidade p66 da TR HIV-1. O mecanismo de inibição parece estar associado a um

reposicionamento de resíduos da cavidade ligante dos INNTRs que causa uma distorção nos resíduos do sítio ativo da TR ¹²⁰. A elevada especificidade dos INNTRs à TR os torna relativamente pouco tóxicos aos pacientes. A TR apresenta uma flexibilidade muito elevada o que permite às regiões ligantes sofrerem significativas variações de volume e dificulta a previsão de atividade de novos INNTRs ¹⁴³. A Nevirapina se inclui nesta classe de inibidores da transcriptase reversa.

Um dos maiores problemas associados ao uso deste medicamento é o desenvolvimento de resistência pelo vírus, o que limita bastante a aplicação deste fármaco. Há o receio de que o uso de nevirapina na contenção da transmissão materno-infantil possa causar, a longo prazo, o surgimento de linhagens resistentes do vírus que inviabilizem a utilização deste fármaco no futuro. ^{144,145}

Há um enorme grupo de mutações relatadas em pacientes que desenvolveram formas do HIV resistentes à nevirapina ¹⁴³. Essas mutações induzem resistência alterando as taxas de dissociação (como as mutações L100I e V106A), de associação (como a mutação K103N), bem como induzindo alterações simultâneas nas taxas de associação ou dissociação entre a enzima e o inibidor (como as mutações Y181I e Y188L) entre a enzima e o inibidor. ¹⁴⁶

O mecanismo de ação destas mutações ocorre de três maneiras, basicamente: pela redução da área superficial de contato entre os aminoácidos e o inibidor, pela modificação na distribuição eletrostática da ligação de hidrogênio envolvida na interação com o inibidor e pela interferência estérica na cavidade ligante do inibidor. ¹⁴⁷

A mutação K103N é a única mutação (cl clinicamente relevante) capaz de conferir ao vírus resistência aos INNTRs que não se localiza na cavidade ligante dos mesmos. O mecanismo de ação desta mutação aparentemente está associado à alteração na interação entre o resíduo 103 e a tirosina 188 que favorece a estabilidade da estrutura da enzima “livre” em relação à estrutura do complexo enzima-inibidor. ¹⁴⁶ Alguns estudos sugerem que a energia de interação entre a nevirapina e a forma mutante da TR é 3,66 kcal/mol menor do que a energia de interação da nevirapina com a forma selvagem da TR devido a de interações de van der Waals ¹⁴⁸. Diante da enorme variedade de mutações capazes de conferir resistência ao vírus HIV-1, tem-se buscado por regiões conservadas da proteína transcriptase reversa para alvo de novos fármacos. Um conjunto de resíduos na cavidade

ligante dos INNTRs (Pro225, Phe227, Trp229, Leu234 e Tyr 318) chamou a atenção dos pesquisadores. Todos estes resíduos são altamente conservados em TR de lentivírus. Os aminoácidos nas posições 227-235 pertencem à região “primer grip”, responsável pela manutenção da terminação 3'-primer em uma orientação suscetível ao ataque nucleofílico pela incorporação de deoxinucleotídeos.¹⁴⁷

Entre estes resíduos, nos chamou a atenção o triptofano da posição 229 (Trp229) e a tirosina na posição 318 (Tyr 318). Estes aminoácidos possuem uma série de propriedades que os tornam interessantes como alvos farmacológicos. Além de serem altamente conservados e importantes na função enzimática, pertencem à cavidade ligante dos INNTRs (com os quais interagem diretamente) e são aminoácidos aromáticos, ou seja, passíveis de interação com grupos químicos eletrofilicos¹⁴⁹.

O presente trabalho pretende estudar o efeito da substituição de átomos de hidrogênio dos anéis aromáticos da nevirapina que interagem com os resíduos aminoácidos conservados Trp 229 e Tyr318 por um grupo dihidroxiborano.

13.3 Resultados

Dando continuidade a estudos anteriores avaliamos um análogo borilado da nevirapina quanto a sua interação com a enzima transcriptase reversa (T.R.) bem como a interação específica com o triptofano 229, um aminoácido fundamental na atividade desta enzima e bastante conservado nas estruturas (Figura 63).

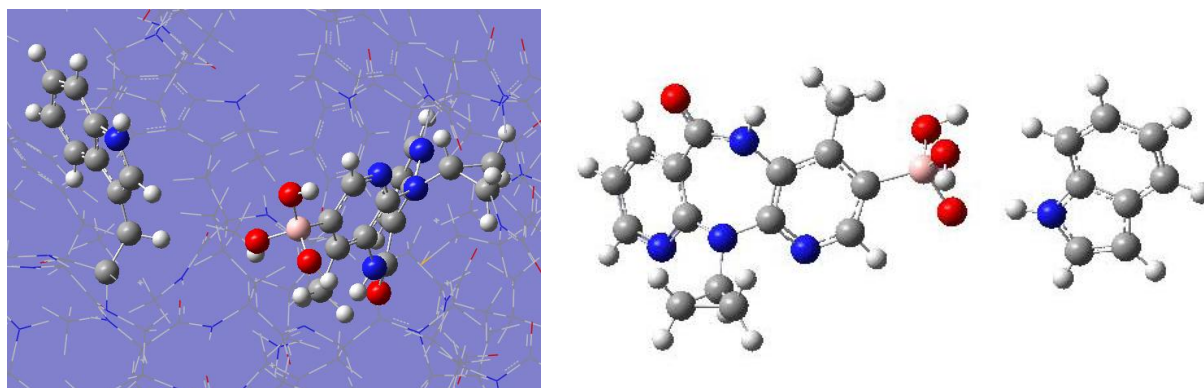


Figura 63 À esquerda, otimização de geometria resultante de cálculo por mecânica molecular e, à direita, otimização de geometria resultante de cálculo ab initio.

A geometria resultante destas otimizações resultam em um desfavorecimento da interação. Os valores de energia igualmente sugerem um desfavorecimento da interação indicando que a interação entre a nevirapina e a enzima T.R. é mais forte do que com o análogo. A parametrização, entretanto, influencia bastante o resultado. Quando simulado (apenas o sistema em interação) em nível **ab initio** observa-se um favorecimento da interação medicamento proteína. A diferença entre o resultado obtido por mecânica molecular (minimização de energia e dinâmica estocástica) e por cálculo **ab initio** (HF 6-31G*) pode derivar da parametrização das cargas do grupo boronato. No campo de força OPLS_2005 utilizado para a simulação, o grupo boronato é descrito com sua carga centrada no átomo de boro. Entretanto, os cálculos **ab initio** revelam que a distribuição de cargas no boronato é mais complexa: a carga negativa distribui-se nos átomos de oxigênio e há uma significativa densidade de carga positiva nos átomos de hidrogênio e de boro. A carga parcial positiva presente nos átomos do nitrogênio cria um sítio de interação com regiões ricas em densidade eletrônica tais como anéis aromáticos. Assim, os resultados discrepantes aqui parecem derivar da parametrização do grupo boronato.

Os valores de energia obtidos nas otimizações de geometria por mecânica molecular também indicam um desfavorecimento da interação ao contrário do cálculo **ab initio** que sugere um favorecimento nesta interação. Os resultados da energia de interação obtidos também indicaram, em geral, um desfavorecimento na interação entre o análogo borilado da nevirapina e a T.R. Embora algumas simulações produzam valores negativos (isto é, favoráveis) há muitos valores positivos elevados indicam da energia de interação indicando desfavorecimento. Visto que o grupo boronato é tratado como um grupo negativo na parametrização, desconsiderando a carga parcial positiva presente nos átomos de hidrogênio deste grupo químico, as possíveis ligações de hidrogênio que se formam são desconsideradas na interação.

Tabela 12 Valores de energia de interação obtidos pela dinâmica estocástica

Enzima (mutação)	Energia de interação eletrostática (Kcal/mol)
Tyr181Cys	77,67
Val108Ile	74,41
Leu100Ile	-10,44

A princípio, poder-se-ia concluir que este análogo seria ativo em algumas formas mutantes da T.R. Entretanto, consideramos estes resultados (Tabela 12) inconclusivos, visto que a ligação de hidrogênio afeta significativamente a interação inibidor-enzima e neste modelo de parametrização (do campo de força OPLS_2005) as ligações de hidrogênio formadas pelo grupo boronato são desconsideradas em virtude da distribuição de cargas parciais adotadas na parametrização.

Capítulo 14

Conclusões

Os cálculos e os testes (tanto *in silico* quanto *in vitro*) sugerem algumas conclusões importantes sobre o trabalho.

(i) É possível notar que moléculas pequenas de ácidos borônicos não têm atividade sobre o *T. cruzi*, mesmo quando são análogos dos ácidos carboxílicos inibidores de histona deacetilase. Provavelmente, esta aparente inatividade se deva à atividade de desboronação oxidativa promovida pela enzima P450, que degrada os ácidos carboxílicos de cadeia curta o que inativa a atividade do mesmo. É possível que ácidos borônicos de cadeia maior tenham atividade visto que a cavidade ativa da enzima P450 possui um volume relativamente pequeno o que talvez favoreça um impedimento estérico da reação de degradação a ácidos borônicos de cadeia longa. Isso justificaria, por exemplo, a elevada atividade de medicamentos como o Bortezomib, e a inatividade de moléculas menores.

(ii) O mecanismo de atividade dos ácidos carboxílicos de cadeia curta (especialmente o ácido butírico) envolve a interação entre o carboxilato e o metal alcalino presente no sítio vicinal. Diferente do exposto na literatura, a atividade não deve envolver exclusivamente a complexação do metal no sítio ativo (isto é, do íon divalente de zinco) uma vez que a transferência de carga entre o inibidor e o íon metálico é inferior nos ácidos carboxílicos de cadeia curta quando comparado com ácidos hidroxâmicos. Isso justificaria a elevada concentração de carboxilato (normalmente necessária em escala de milimolar para promover a inibição da histona deacetilase) ao contrário dos inibidores ácidos hidroxâmicos, os quais são capazes de promover a mesma inibição em concentração da ordem de micromolar. A existência deste sítio vicinal próximo ao sítio ativo participando da atividade inibitória revela uma forma de inibição pouco usual com características tanto competitiva quanto alostérica, visto que a interação do inibidor continua ocorrendo também no sítio ativo. O tamanho deste sítio alostérico promove um impedimento estérico que justifica a inatividade de ácidos carboxílicos de cadeia lateral maior do que a do ácido butírico. A atividade mais elevada do

ácido butírico se deve provavelmente a similaridade deste ácido carboxílico com o aminoácido aspartato, o qual está muito presente tanto no sítio ativo quanto no sítio vicinal da enzima histona deacetilase.

(iii) O sítio ativo da histona deacetilase é muito rico em aminoácidos carregados. Assim, a interação eletrostática deste sítio com moléculas carregadas tais como as betaínas, é bastante favorecida. Os resultados da simulação da betaína no sítio ativo da histona deacetilase sugerem que a utilização de moléculas zwitteriônicas como inibidores desta enzima pode favorecer a atividade inibitória. É possível também a conhecida atividade epigenética (a qual é tradicionalmente atribuída à doação de grupos metil da betaína e ao conseqüente efeito da metilação do DNA) possa ter uma importante contribuição do efeito de inibição da histona deacetilase.

(iv) Os experimentos com os inibidores de ciclo-oxigenase revelaram uma ausência de atividade que reforça a hipótese de que os ácidos carboxílicos de cadeia curta inibidores de histona deacetilase são inativos devido a diferenças estruturais entre a enzima do protozoário e as enzimas de outros organismos eucariotos. É notável também, que o análogo ácido butil-salicílico não apresenta atividade (já que é conhecido na literatura a atividade do ácido acetil salicílico) sugerindo que a atividade sobre o protozoário observada no AAS deriva do grupo acetil presente nesta molécula.

(v) O ácido butilhidroxâmico é um potencial novo inibidor da enzima histona deacetilase. Os dados de simulação sugerem que a presença do nitrogênio aumenta a transferência de carga entre o inibidor e o cátion da metaloenzima favorecendo a interação entre os mesmos. É notável também que o isômero iminol possui uma maior transferência de carga quando comparado ao isômero ceto o que sugere que este isômero pode contribuir de forma importante na atividade dos ácidos hidroxâmicos na inibição da histona deacetilase.

(vi) A inatividade da nevirapina sobre a forma epimastigota ao mesmo tempo em que se observa a atividade deste composto sobre a forma amastigota sugere que o elevado grau de alterações morfológicas ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi* torna a forma amastigota mais

suscetível da abordagem quimioterapêutica. Este resultado nos revela um potencial alvo para a quimioterapia para a forma cardíaca da Doença de Chagas visto que o medicamento foi capaz de inibir o crescimento do protozoário dentro de células cardíacas em concentrações farmacologicamente aceitáveis.

(vii) A atividade da nevirapina especificamente sobre a forma amastigota do *T. cruzi* possivelmente seja originada da atividade dos metabólitos, isto é, das formas oxidadas e hidroxiladas) da nevirapina produzidos pelo metabolismo da célula hospedeira. Estes metabólitos possuem um nível de citotoxicidade maior do que a do próprio inibidor o que justificaria a aparente inatividade deste composto sobre a forma epimastigota.

(viii) A pesquisa pela atividade *in silico* de moléculas boriladas análogas da nevirapina não demonstrou indícios de atividade inibitória destas moléculas sobre a enzima transcriptase reversa do HIV-1. Entretanto, os parâmetros do OPLS para o grupo boronato parecem não descrever de forma satisfatória este sistema visto que a densidade eletrônica do grupo boronato é bastante afetada pelos anéis aromáticos presentes na molécula de nevirapina. Assim, consideramos estes resultados inconclusivos devido ao erro associado a esta simulação.

Capítulo 15

Perspectivas

Os resultados obtidos neste trabalho nos motivaram a continuar as linhas de pesquisa investigadas aqui com o objetivo de aprofundar a compreensão dos mesmos. Abaixo listamos alguns trabalhos que pretendemos dar andamento futuramente:

- Avaliar a atividade tripanocida de análogos hidroxâmicos do ácido butírico. Aparentemente, a atividade dos ácidos hidroxâmicos com enzima histona deacetilase é mais favorecida do que a interação do ácido butírico com esta enzima. Visto que a síntese destes compostos (tais como o ácido butil hidroxâmico) é relativamente simples, pretende-se proceder os ensaios *in vitro* da atividade tripanocida destes compostos com o propósito de avaliar a viabilidade de uso farmacológico do mesmo.
- Os resultados com a atividade em células L6 da nevirapina precisam ser melhor investigados. Pretende-se efetuar testes em murinos (camundongo) para uma avaliação *in vivo* mais precisa destes resultados.
- Pretende-se também proceder a otimização e implementação de parametrização do elemento químico boro (especialmente no comportamento do grupo boronato) no campo de força OPLS_2005.
- Estamos implementando o método das q-integrais no programa GAMESS e no nosso código para cálculo de propriedades eletrônicas em macromoléculas. Esta metodologia viabilizará o aumento do número de átomos do sistema molecular de interesse visando o estudo da interação fármaco-proteína.
- Adicionalmente estamos implementando as rotinas computacionais para o cálculo de índices moleculares multicêntricos ¹⁰² aplicados à cálculo de estrutura eletrônica em biomoléculas.¹⁵⁰

16. Referências Bibliográficas

1. DiMasi, J.A.; Hansen, R.W.; Grabowski, H.G.; *J. Health Econ.* **2003**, 22, 151.
2. Silvermann, R.B.; *Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press: San Diego, 1992.
3. Celotti, F.; *Pharmacol. Res.* **2001**, 43, 429.
4. Briceño-León, R. *Cadernos de Saúde Pública*, **2009**, 25, S71.
5. Buekens, P; Almendares, O; Carlier, Y, Dumonteil E., Eberhard M., Gamboa-Leon R., *Maternal and Child Health* **2008** 12, 283.
6. Guerri-Guttenberg, R.A.; Grana D.R.; Ambrosio G.; Milei J., *Eur. Heart J.* **2008** 29, 2587.
7. Dias J. P., B. C., Araújo E., Mascarenhas A. V., Martins N. E., Grassi F., *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2008**, 41, 296.
8. Filho G.B., *Bogliolo Patologia*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 7ª ed, 2006.
9. Rey, *Parasitologia*, 4ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
10. <http://www.tulane.edu/~wiser/protozoology/notes/kinet.html> acessado em setembro de 2010.
11. Hernández-Osorio L. A., Marquez-Dueñas C., Florencio-Martínez L. E., Ballesteros-Rodea G., Martínez-Calvillo S., and Manning-Cela R.G.; *J. Biomed. Biotechnol.*, **2009**, 2010, 283842.
12. Tomlinson S., Vandekerckhove F., U. Frevert, Nussenzweig V.; *Parasitol.*, **1995**, 110, 547.
13. Villalta F.; Kierszenbaum F.; (*BBA*) – *Biomembranes*, **1983**, 736, 39.
14. Fernandes M.C.; *Int. J. Parasitol* **2007**, 37, 1431.
15. Ley V., Andrews N.M., Robbins E.S., Nussenzweig V., *J. Exp. Med.* **1988**; 168, 649.
16. Bahia D., Alves Da Silva E., Oliveira, M. Cruz P., Gaspar E., Hernandez E. Mortara R., *New Biotechnol*, **2009**, 25, S373.
17. Nardelli, S.C.; da Cunha, J.P.C.; Motta, M.C.M., *Chromossoma* **2009**, 118, 487.
18. Warren L., Ernest J., *Microbiologia Médica e Imunologia*, 4ª ed. ArtMed: Porto Alegre, 1998.
19. Wen J.J., Dhiman M., Whorton E. B., Garg N. J., *Microbes and infection* **2008** 10, 1201.
20. <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.htm> acessado em junho de 2011.
21. Báez A.L., Lo Presti M.S., Rivarola H.W., Pons P., Fretes R., Paglini-Oliva P. *Exp. Parasitol.* **2008** 120, 397.
22. Andrade Z. A.; Andrade S.G., *Patologia in Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Zigman Brenner, Zilton Andrade, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 1979.
23. Torrecilhas A.C.T.; Tonelli R. R.; Pavanelli W. R.; *Microbes and Infection*, **2009**, 11, 29.
24. Lauria-Pires L., Castro C. N., in *Doença de Chagas e Evolução*, Editora UnB, Brasília 2007.
25. Urbina J.A., Docampo R.; *Trends parasitol.* **2003**, 9, 495.
26. Ribeiro, I.; Sevcsik A.M.; Alves F.; Diap G., Don R., Harhay M.O., Chang S., Pecoul B., *PLOS* **2009**, 3, e484.
27. Clayton J., *Nature*, **2010**, 465, S4.
28. Probst A.V.; Dunleavy E.; Almouzni G.; *Mol. Cell Biol.*, **2009**, 10, 192.
29. Lopez-Rubio J. J.; Riviere L. Scherf A.; *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, 10, 560.
30. Huerta S., Goulet E. J., Huerta-Yepez S., Livingston E.H. *J. Surgical Res.* **2007** 139, 143.
31. Henderson C., *Drug Resistance Updates*, **2003**, 6, 247.
32. Lan, *Apoptosis* **2007**, 12, 573.
33. Duszenko M.; Figarella K.; Macleod E.T.; and Welburn S.C.; *Trends parasitol*, **2006**, 22, 536.
34. De Souza E. M., Nefertiti A. S. G., Bailly C., Lansiaux A. and Soeiro M. N. C., *Cell Tissue Res* **2010**, 341, 173.

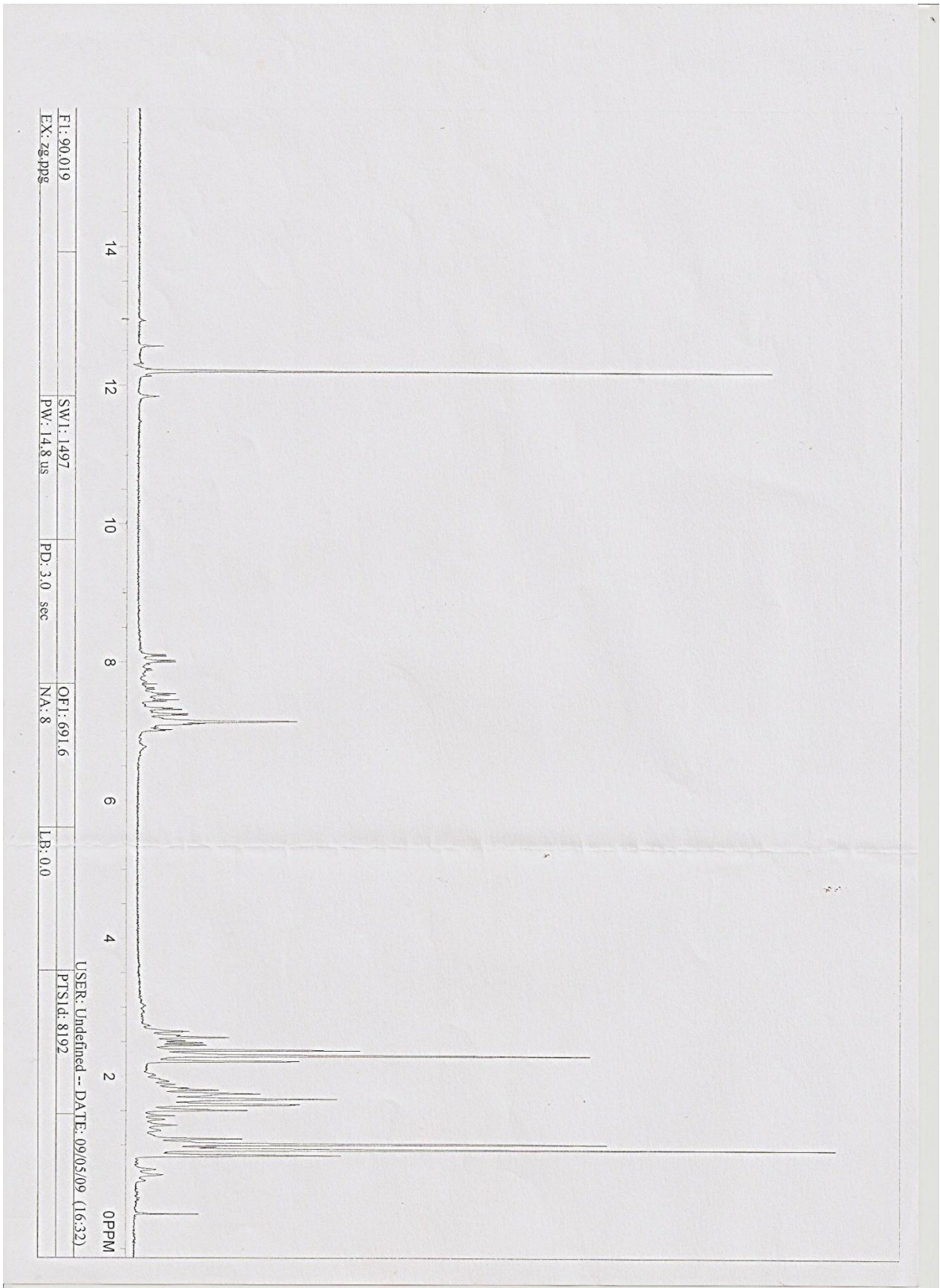
35. Menna-Barreto, R. F. S.; Salomao, K; Dantas, AP, Santa-Rita R. M., Soares M. J., Barbosa H. S., Castro S. L., *Micron* **2009** 40, 157.
36. Lubert Stryer; *Bioquímica*; 3ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.
37. Monneret C.; *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 1.
38. Respuela P., Ferella M., Rada-Iglesias A., Aslund L., *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 23, 15884.
39. Grozinger C.M.; Schreiber S.L.; *Chem Biol*; **2002**, 9, 3.
40. Martin M, Kettmann R, Dequied F, *Oncogene* **2007**, 26, 5450.
41. Smith B.C.; Bemu J.M.; *Biochimica et Biophysica Acta* **2009** 1789, 45.
42. Cunha J.P.C.; *Mol. Biochem Parasitol*, **2006**, 150 268.
43. Mandava V. et. al.; *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2007** 156 41.
44. Belli S. I., *Int. J. Parasitol.* **2000** 30, 679.
45. Mai A., Altucci; *Int. J. Biochem. Cell B.* **2009** 41,199.
46. Cousens L.S.; Gallwitz, D. & Alberts B. M. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 1716.
47. Kumaran S.; Gupta S.P., *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.*, **2007**, 22, 1, 23.
48. Eot-Houllier G., *Cancer Letters*, **2009** 274, 169.
49. Liu T., Kuljaca S., Tee A., Marsall G. M., *Cancer treatment Reviews*, **2006**, 32, 157.
50. Ramos M.G., Rabelo F.L.A., Duarte T., Gazzinalli R.T., and Alvarez-Leite J.I., *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2002** 35, 161.
51. Belakavadi M., Prabhakar B.T., Salimath B. P., *B.B.A.-General subjects* **2007** 1770, 39.
52. Chen J., Ghazawi F. M., Bakkar W. and Li Q., *Mol. Cancer* **2006** 5, 71.
53. Rephaeli A., Entin-Meer M., Angel D., Tarasenko N., Gruss-Fischer T., Bruachman I., Phillips D. R., Cutts S. M., Haas-Kogan D., Nudelman A., *Invest New Drugs* **2006** 24, 383.
54. Richard D., Hollender P., Chénais B, *FEBS Letters* **2002** 518, 159.
55. Draffin S. P., Dugan P. J., Duggan S. A. M., and Norrild J. C. *Tetrahedron*, **2003** 59, 9075.
56. Reid T., Valone F., Lipera W., Irwin D., Paroly W., Natale R., Screedharan S., Keer H., Lum B., Scappaticci F., Bhatnagar A., *Lung Cancer*, **2004** 45, 381.
57. Ouaisi M, Ouaisi A., *J. Biomed. Biomol.*, **2006**, 1.
58. Meinke P T, Schmatz D, Fisher M H, *WO200107042-A*, Novel apicidin-derived cyclic tetrapeptides useful for treating protozoal infections, MERCK & CO INC, **2002**
59. Stryer Lubert, *Bioquímica*, terceira edição, Rio de Janeiro, RJ, 1992.
60. Denis P., Ventura O.N.; *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2001**, 537, 173.
61. Turi L., Dannenberg L.L.; Rama J., Ventura O. N., *J. Phys. Chem.* **1992**, 96, 3709
62. Saldyka M., Mielke Z., *Vibrational Spectroscopy*, 45, **2007**, 46.
63. R. Senthilnithy B., S. Weerasinghe a, D.P. Dissanayake, *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2008**, 851, 109.
64. Ooi C. C., Good N. M., Williams D. B., Lewanowitsch T., Cosgrove L. J., Lockett T. J. and Head R. J.; *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **2010**, 37, 482.
65. Dannis G. Hall, *Boronic Acids, Preparation, Applications in Organic Synthesis and Medicine*, Wiley-VCH, Alberta, Canada, 2005.
66. Gallop P.M., Paz M.A., and Henson E. *Science* **1982**, 217, 4555, 166.
67. Kliegel, W.; *BOR in Biologie, Medizin und Pharmazie*, Springer-Verlag, Berlin, 1980.
68. Ashok, B. Shenvi; *Biochemistry*, **1986**, 25, 1286.
69. Gustav E. Lienhard G. E., Koehler, *Biochemistry*, **1971**, 10, 2477.
70. Koehler, K. A., Hess G. P., *Biochemsitry*, **1974**, 13, 5345.
71. Groll, M.; Berkers, C. R.; Ploegh, H. L. and Ovaa, H.; *Structure*, **2006**, 14, 451.
72. Rogowasa, P.; Cyrański, M.K.; Sporzyński, A.; and Ciesielski, A. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 9, 1389.

73. Matthews, et al. *J Biol Chem*, **1975**, 250, 18, 7120.
74. Freeman, A.; Segal, R.; Dror, Y.; Methods and Compositions For Treating Fungal Infections, Pat. PCT/US2002/023252, WO/2003/009689 **2001**.
75. Combe-Marzelle S.P., Kakkar S. K., Allen G.D., Boronate Medicaments for Preventing Thrombosis During Surgery Pat. PCT/GB2005/000908, WO/2005/084686.09 Mar **2004**.
76. Patrick G.M., Combe-Marzelle S.P., Kennedy A. J., Withington R., Bocher O. V. A., Boronate Medicaments Suitable for Short Duration Anticoagulation Pat. PCT/GB2005/000907, WO/2005/084685., **2004**.
77. Deadman J. J., Spencer J., Greenidge P. A., Goodwin C. A., Kakkar V. V., Scully M. F., Holland R. J., Serine Protease Inhibitors Comprising a Hydrogen-Bond Acceptor Pat. PCT/GB2002/000224, Pat. WO/2002/057273., **2001**.
78. Snow R. J., Bachovchin W. W., Randall W.B., Campbell S. J., Coutts S. J., Freeman D. M., Gutheil W.G., Kelly T. A., Kennedy C. A., Krolikowski D. A., Leonard S. F., Pargellis C. A., Tong L. and Adams J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 10860.
79. Yang, W.; Gao, X.; Wang, B.; *Med Res Rev*, **2003**, 23, 346.
80. Labutti, J.; Parsons, I.; Huang, R.; Miwa, G.; Gan, L-S. and Daniels J. S.; *Chem. Res. Toxicol.*, **2006**, 19, 539.
81. Plamondon L., Grenier L., Adams J., Gupta S., Formulation of Boronic Acid Compounds, Pat. PCT/US2002/002086, Pat. WO/2002/059131., **2001**.
82. Altamore T., Duggan P. J., Krippner G. Y., *Bioorgan Med Chem*, **2006**, 14, 1126.
83. Suzuki N., Suzuki T., Yosuke Ota Y., Nakano T., Kurihara M., Okuda H., Yamori T., Tsumoto H., Nakagawa H., Miyata N. *J. Med Chem* **2009** 52, 2909.
84. Estiu G., Greenberg E., Christopher B. Harrison C. B., Nicholas P. Kwiatkowski N. P., Ralph Mazitschek R., James E. Bradner J. E., Olaf Wiest O. *J. Med. Chem.* **2009** 51, 2898.
85. Guo Y., Xiao J., Guo Z., Chu F., Cheng Y., Wu S. *Bioorg. Med. Chem.* **2005** 13, 5424.
86. Lesk A. M.; *Introduction to Physical Chemistry Prentice-Hall, Inc.*, London, 1982.
87. Smith, W. B.; *Introduction to Theoretical Organic and Molecular Modelling*, Wiley-VCH, New York, 1996.
88. Quinn, C. M.; *Computational Quantum Chemistry an Interactive Guide to Basis Set Theory*, Academic Press, San Diego, 2002
89. Hinchliffe, A.; *Modelling Molecular Structures*, second edition, John Wiley & Sons, Chichester, 1999.
90. Chirlian, L.E.; and Francl, M. M.; *J. Comput. Chem.*, **1987**, 8, 6, 894.
91. Hehre, W. J.; Ditchfield, R.; Pople, J. A.; *J. Chem. Phys.* **1972**, 5, 2257.
92. Lozynski M.; Rosinska-Roszak D., *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 2899.
93. Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C., *Mol. Simulat.*, **1988**, 1, 173.
94. Jorgensen W.L., Tirado-Rives J., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 6, 1657.
95. Kaminski, G.A. ; Friesner R.A., Jorgensen W.L., Tirado-Rives J., *J. Phys. Chem. B.* **2001**, 105, 6474.
96. Banci L., *Curr. Opinion Chem. Bio.*, **2003**, 7, 143.
97. Soares. T. A., Straatsma, *Mol. Simulat.*, **2008**, 34, 3, 295.
98. Knapp B., Frantal S., Cibena M., Schreiner W., Bauer P., *J. Comput. Biol.*, **2011**, 18, 995.
99. Goodford P.J.; *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 849.
100. Hu X., Shelver W.H. *J. Mol. Graph. Model.* **2003**, 22, 115.
101. Lipparini F., Scalmani G., Mennucci B., Cancès E., Caricato M., and Frisch M.J., *J. Chem. Phys.* **2010**, 133, 014106.
102. Rangel, F C; Montel, A L B; Mundim, K. C, *Mol Simulat* **2009**, 35, 342.

103. Zahid M., Saeed M., Rogan E.G, Cavaliere E. L., *Free Radical Bio* **2010**, 48, 318.
104. Tasdemir D., Kaiser M., Brun R, Yardley V; Schmidt T.J., Tosun F and Rüedi P.; *Antimicrob. Agents Ch* **2006**, 1352.
105. Larkin J.D., K.L., Bhat K. L., Markham G.D. Brooks .B R., Lai J. H., Bock C. W.; *J. Phys. Chem. A* **2007**, 111, 6489.
106. Rittle J. Grenn M.T.; *Science* **2010** 330, 2010.
107. Labutti J., Parsons I.,Huang R.; *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, 19, 539.
108. Souza W.; *Parasitol Res*, **2002**, 88, 1013.
109. Filho O. A. S., Alencastro R. B., *Quím. Nova*, **2003**, 26, 2, 253.
110. Habtemariam S., *Phytotherapy Res.*, **1995**, 9, 603.
111. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M.; *Pharmacology, International Student Edition*, third edition; Churchill Livingstone, Edinburgh, 1995.
112. Kubata B.K.; Duszenko M.; Martin K.S.; Urade Y.; *Trends parasitol.* **2007**, 23, 325.
113. Lopes-Muñoz R., Faúndez M., Klein S., Escanilla S., Torres G., Lee-Liu D., Ferreira J., Kemmerling U., Orellana M., Morello A., Ferreira A., Maya J.D., *Exp. Parasitol.*, **2010**, 124, 167.
114. Hulsman N.; Medema J. P.; Bos C.; *J. Med. Chem.* 50, **2007**, 2424.
115. Jenwitheesuk E.; Horst J.A.; Rivas K.L.; Voorhis W.C.V.; Samudrala R.; *Trends in Pharmacol. Sci.* **2008**, 29, 62.
116. Naveau B.; *Joint Bone Spine* **2005**, 72, 199.
117. Dunlap T., Abdul-Hay S.O., Chandrasena REP, *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* **2008**, 19, 115.
118. Mehta S. K., Kaur G., Bhasin K.K.; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, 60, 95.
119. Sekhavat A.; Sun J-M; Davie J.R.; *Biochemistry and Cell Biology – Biochimie et Biologie Cellulaire* **2007**, 85, 751.
120. Esnouf, R.; Ren, J., Ross C.; Jones, Y.; Stammers, D.; Stuart, D.; *Nat. Struct. Biol.* **1995**, 2, 303.
121. Sarafanios, G. S.; Das K.; Hughes, S. H.; Arnold, E.; *Curr Opin Struc Biol*, **2004**, 14, 716.
122. Merluzzi; *Science*, **1990**, 250, 1411.
123. Newel; T. Roy. *Soc. Trop. Med. H.* **2005** october, 7.
124. Manosuthi, W.; Chumpathat, N.; Chaovavanich, A.; Sungkanuparph, S.; *BMC Infectious Diseases* **2005**, 5, 67.
125. De Clercq. E.; *J. Clin. Virol.* **2004**, 30, 115.
126. Björnsson, E. and Olsson, R.; *Liver and Disease*, **2006**, 38, 33.
127. Chen J., Mannargudi B.M., Xu L., and Uetrecht J., *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, 21, 1862.
128. Teixeira, A. R. L. C., Pharmaceutical Compositions for the Treatment of Tripanossomiasis and Chagas Disease, Pat 2008022422, WO/2008022422-A1, 2007.
129. Hutchinson, J. F.; *Annu. Rev. Antropol.* **2001**, 30, 85.
130. Stoiber, H.; Clivio A.; Dierich, M. P.; *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, 15, 649.
131. www.unaids.org, acessado em abril 2006.
132. www.unaids.org, acessado em setembro 20:07.
133. <http://www.agenciaaids.com.br> acessado em abril de 2006.
134. <http://www.mclcd.co.uk/hiv/> acessado em setembro de 2006.
135. Guyader, M.; Emerman, M.; Sonigo, P.; Clavel, F.; Montagnier, L. & Alison M.; *Nature* **1987**, 326, 662.
136. McGrath, K. M.; Hoffman, N. G.; Resch, W.; Nelson J. A. E.; Swanstrom R.; *Virus Res*, **2001**, 76, 137.

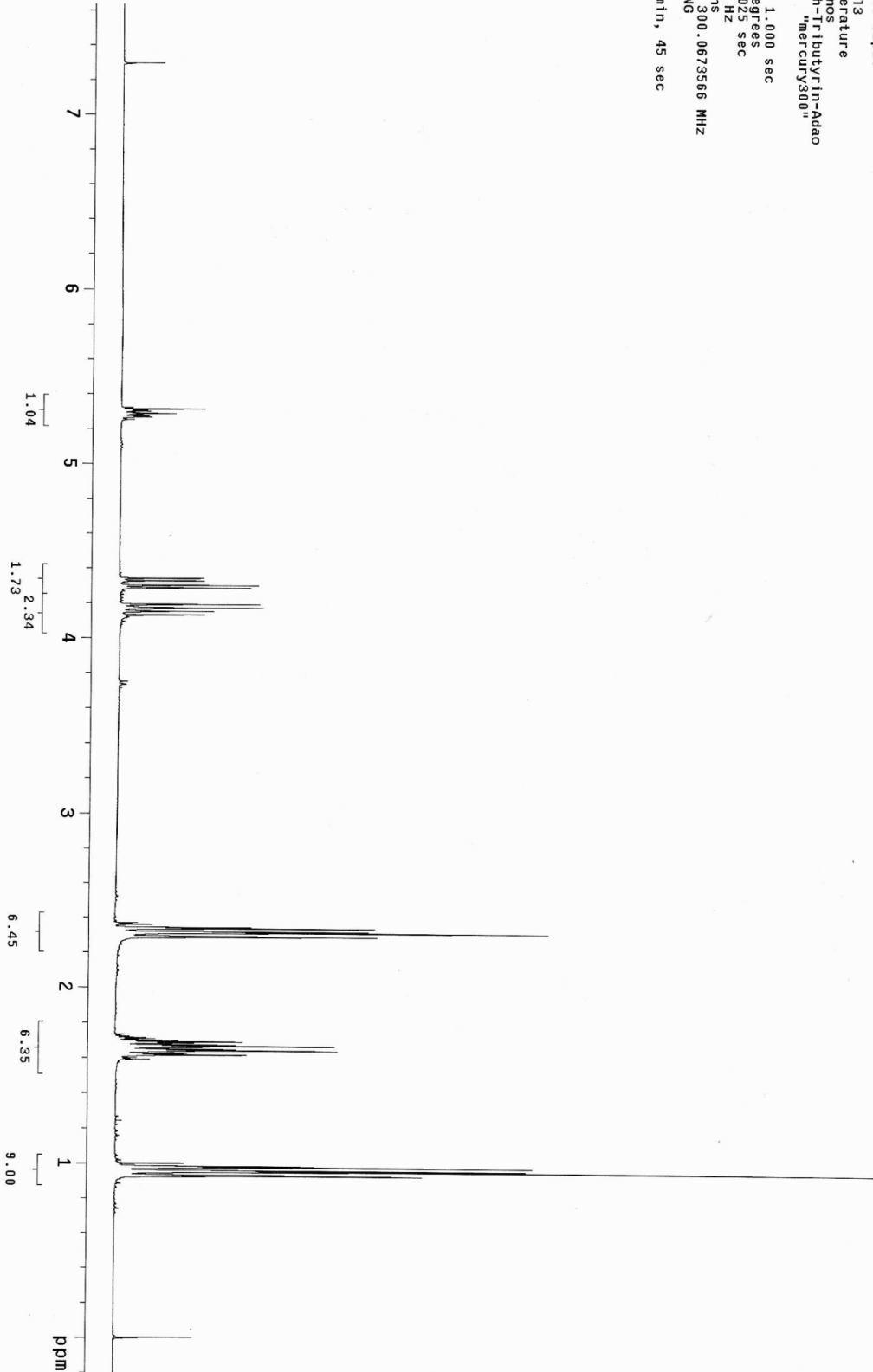
137. Schlick, T. Antman, S.S.; Marsden, J.E.; Sirovich, L.; Wiggins, S.; *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*; Springer; New York, 2002.
138. Yeni, P.; *J. of Hepatol.* **2006**, 44, S100.
139. Clerq, E. D.; *Médecine et Maladies Infectieuses*, **2000**, 30, 421.
140. Schlick, T. Antman, S.S.; Marsden, J.E.; Sirovich, L.; Wiggins, S.; *Molecular Modeling and Simulation: An Interdisciplinary Guide*; Springer; New York, **2002**, 21, 49.
141. Day, L.; Shikuma, C., Gerchenson, M., *Mitochondrion*, **2004**, 4, 95.
142. Chandra, A., *Febs Letters*, **1986**, 197, 12.
143. Titmuss, S. J.; Keller, P. A.; Griffith, R.; *Bioorgan Med Chem* **1999**, 7, 1163.
144. Smith, D.M.; *AIDS*, **2006**, 20, 281.
145. Ruengpung, et.al., *J. Clin. Virol.*, **2005**, 34, 272.
146. Rodriguez-Barrios, F.; Balzarini, Gago F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 7570.
147. Hopkins, L. A.; Ren, J.; Milton, J.; Hazen, R. J.; Chan, J. H.; Stuart, I. D.; Stammers; *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5912.
148. Zhou, Z.; Madrid, M.; Evanseck, J. D.; Madura, J. D.; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 49, 17253.
149. Pelemans, H.; Esnouf, R.; De Clerq, E.; Balzarini, J.; *Mol. Pharmacol.* **2000**, 57, 954.
150. Rangel F.C., Oliveira HCB, Montel A.L.B.Montel, Mundim K.C., *Physica A*, **2010**, 319, 5208.

Anexo I



Anexo II

2010-09h-Tributyri-in-Adao
File: home/alunos/vnmr/sys/data/2010-09h-Tributyri-in-Adao.fid
Pulse Sequence: s2pul1
Solvent: cdcl3
Ambient: temperature
Operator: alunos
File: 2010-09h-Tributyri-in-Adao
Mercury-300B8 "mercury300"
Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 9.025 sec
Width 3601.0 Hz
16 repetitions
OBSERVE H1, 300.0673566 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 2 min, 45 sec



RESUMO (Patente)

Uso de uma quantidade eficiente de nevirapina na preparação de uma composição para o tratamento da cardiomiopatia da doença de Chagas

A doença de Chagas é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitida ao homem por insetos hematófagos, como alguns barbeiros muito comuns na América do Sul com ampla disseminação no Brasil. Embora haja tratamento para a forma aguda da doença, a cardiomiopatia que ocorre durante a fase crônica ainda não possui um tratamento específico recebendo apenas um tratamento sintomático. A cardiomiopatia da doença de Chagas é uma das maiores causas de letalidade desta patologia. A presente invenção refere-se a um método de tratamento da cardiomiopatia chagástica através da administração de nevirapina ou de composições farmacêuticas aceitáveis deste princípio ativo visando a redução da replicação intracelular do *T. cruzi* amastigota. O método reduziria os efeitos deletérios da infecção parasítica no músculo cardíaco do paciente.