

Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura: Triagem Virtual e Avaliação Bioquímica de Novos Inibidores da Cruzaína de *Trypanosoma cruzi*

Gustavo H. G. Trossini(PQ)^{1,2,*}, Andrei Leitão (PQ)³, Tudor I. Oprea (PQ)³
Adriano D. Andricopulo (PQ)², Elizabeth I. Ferreira (PQ)¹ *trossini@usp.br

¹Laboratório de Planejamento de Quimioterápicos Contra Endemias Negligenciadas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, ²Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, ³Department of Biocomputing, University of New Mexico - USA

Palavras Chave: *Trypanosoma cruzi*, cruzaína, triagem virtual, inibidores enzimáticos.

Introdução

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, apresenta-se como um grave problema de saúde pública para a América Latina. Afeta cerca de 15 milhões de pessoas, causando 21.000 mortes ano. O arsenal terapêutico disponível contra a parasitose é composto por apenas dois fármacos, nifurtimox e benznidazol, ambos com baixa eficácia e graves efeitos adversos, sendo, portanto, urgente a busca por novas alternativas quimioterápicas.¹ O processo de descoberta de fármacos envolve, entre outras etapas, a escolha de um alvo biológico apropriado. A cruzaína, uma cisteíno-protease envolvida em vários estágios de desenvolvimento e diferenciação do *T. cruzi* e também na invasão e modificação da resposta imune do hospedeiro, é considerada um alvo promissor no planejamento de inibidores candidatos a agentes antichagásicos.² Atualmente, existem 17 estruturas cristalográficas da cruzaína disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB), as quais fornecem boas perspectivas para a aplicação de métodos de química- e bioinformática. O planejamento de fármacos baseado na estrutura (*Structure-Based Drug Design*, SBDD) é um método extremamente útil na identificação e otimização de inibidores enzimáticos³. No presente estudo utilizamos uma abordagem moderna de SBDD, que consiste na criação de um modelo farmacofórico para a cruzaína,⁴ e subsequente triagem virtual de bases de dados com o objetivo final de identificar candidatos a inibidores da enzima alvo (Figura 1).

Resultados e Discussão

O modelo farmacofórico foi construído com base no estudo de estruturas da cruzaína e de outras cisteíno-proteases (e.g., catepsina K, catepsina L e falcipaina), buscando a geração de um padrão molecular de alta afinidade e seletividade. O modelo construído foi usado na triagem virtual da base de dados CHEMDIV, composta por 700 mil moléculas. Vários filtros moleculares foram aplicados com auxílio do programa UNITY (SYBYL 8.0), para a seleção de compostos com as seguintes características: H, C, N, O, F, Cl, Br, I, P e S; massa molar entre 300 e 700 Da; cLog *P* entre -2 a 5; doadores e aceptores de ligação de hidrogênio de 2-10; grupos aromáticos 0-6). A aplicação dos filtros levou a uma redução significativa da base para 3.105 moléculas. Os compostos selecionados foram submetidos ao processo de docagem molecular utilizando o programa GOLD (GOLDScore) e a estrutura cristalográfica da cruzaína

(PDB ID 1me4), com flexibilidade dos resíduos de aminoácido presentes no sítio ativo. Realizou-se, então, a análise visual das poses das 100 moléculas mais bem ranqueadas. Na inspeção visual considerou-se a interação entre os ligantes e o sítio de ligação da cruzaína, além de características moleculares tanto do ligante quanto do receptor, tais como flexibilidade e complementaridade química e espacial. Ao final deste processo, 11 moléculas foram selecionadas e avaliadas *in vitro* contra a enzima cruzaína de *T. cruzi*. Todos os compostos apresentaram inibição substancial da enzima alvo à concentração de 50 µM, sendo que os 3 melhores, sendo duas sulfonamidas e uma amida furânica, apresentaram inibição entre 70-90 %.

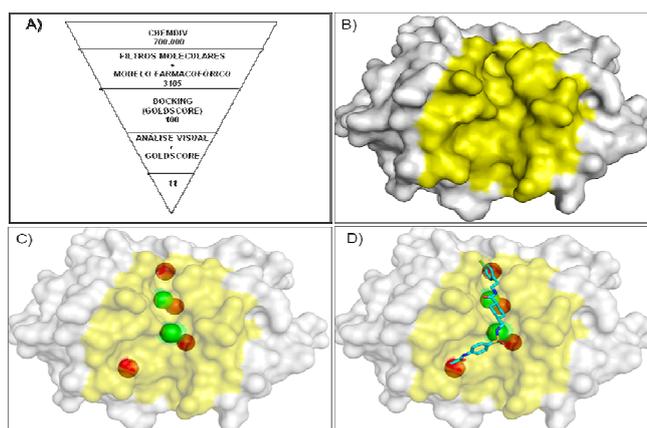


Figura 1. A) Esquema da triagem virtual realizada; B) Estrutura da cruzaína (em amarelo a região do sítio ativo); C) Modelo farmacofórico gerado; D) Docagem do ligante F259-0384 (cod. CHEMDIV) que apresentou 90% de inibição da cruzaína na concentração de 50 µM.

Conclusões

O planejamento de inibidores da cruzaína com base na estrutura do receptor, utilizando a integração entre os métodos computacionais e experimentais, busca virtual e ensaios de inibição da cruzaína, mostrou-se promissor na busca de antichagásicos potenciais e seletivos, tendo essa enzima como alvo.

Agradecimentos

FAPESP(processos 01/01192-3 e 08/57823-0 BOLSA PÓS-DOC) e CNPq.

¹ WHO: <http://www.who.int/tdr/diseases>, acessada em Setembro 2009.

² Sajid, M.; McKerrow, J.H., *Mol. Biochem. Parasitol.* **2002**, 120, 1.

³ Kolb, P. *et al*, *PNAS*, **2009**, 106, 6843.