

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de
potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de
Trypanosoma cruzi

Peterson de Andrade

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de
potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de
Trypanosoma cruzi

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências

Área de concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos

Orientado: Peterson de Andrade

Orientadora: Profa. Dra. Ivone
Carvalho

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 08/05/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Peterson de Andrade.

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*. Ribeirão Preto, 2012.

183p. : il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientadora: Profa. Dra. Ivone Carvalho.

1. Doença de Chagas
2. *Trypanosoma cruzi*
3. *trans*-Sialidase
4. Síntese de carboidratos
5. Modelagem molecular

FOLHA DE APROVAÇÃO

Peterson de Andrade

Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientado: Peterson de Andrade

Orientadora: Prof. Dra. Ivone Carvalho

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais Arlindo (*in memorian*) e Leonor por terem me dado muito mais do que oportunidade e estudo;

à minha querida esposa Lívia e filha Lavínia por serem uma bênção de Deus na minha vida;

às minhas irmãs Érika e Éllen pelo convívio e incentivo

e àqueles que realmente são meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar àquele que me deu a vida, que tem sido meu refúgio nos momentos difíceis e que tem guiado meus passos dia após dia, Jesus Cristo.

Agradeço à minha família que me ensinou a lutar e a perseverar pelos meus sonhos.

Agradeço à professora doutora Ivone Carvalho a orientação durante todo esse tempo, a paciência e compreensão, as oportunidades que me ofereceu, o conhecimento que me agregou e a confiança que depositou em mim ao desenvolver esse trabalho.

Agradeço ao professor doutor Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva a orientação durante desenvolvimento do trabalho de modelagem molecular.

Agradeço aos técnicos Luís Otávio Zamoner, Marcelo Rodrigues de Carvalho, Vinícius Palaretti, José Carlos Tomaz e à técnica Cláudia Castania todo apoio e disposição em ajudar ao longo desses anos.

Agradeço aos amigos do laboratório de Química Farmacêutica Lílian, Adriane, Vanessa, Valquíria, Milena, Carol, Mônica, Helen, Michele, Maristela, Samanta, Denise, Susimaire, Warley, Daniel, Pedro, Vinícius, Getúlio, Oswaldo, Flávio, Ricardo, Evandro, Jonathan, Armando e Thiago os momentos de alegria e de frustração que compartilhamos ao longo dos últimos anos, bem como a convivência extremamente agradável e muito divertida dentro e fora do laboratório.

Agradeço a CAPES e a FAPESP o financiamento, sem o qual não poderia ter trabalhado em tempo integral neste projeto.

Se te mostrares fraco no dia da angústia, a tua força será pequena.

Provérbios 24: 10

Dá força ao cansado, e multiplica as forças ao que não tem nenhum vigor.

Os jovens se cansarão e se fatigarão, e os moços certamente cairão;

Mas os que esperam no SENHOR renovarão as forças, subirão com asas como

águias; correrão, e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão.

Isaías 40: 29-31

RESUMO

DE ANDRADE, P. **Planejamento, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais inibidores da enzima *trans*-sialidase de *Trypanosoma cruzi***. 2012. 183 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma das doenças tropicais mais devastadoras e é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. O parasita expressa uma enzima de superfície, *Trypanosoma cruzi trans*-sialidase (TcTS), responsável pela transferência de ácidos siálicos de células do hospedeiro para moléculas de β -galactose terminais presentes em glicoproteínas de sua superfície. As moléculas de glicoproteína sialiladas estão envolvidas na adesão e subsequente penetração do parasita em células hospedeiras. Logo, TcTS desempenha papel fundamental no reconhecimento e na invasão de células do hospedeiro. Além disso, a ausência de *trans*-sialidase em seres humanos faz de TcTS um alvo potencial a ser explorado, no entanto nenhum inibidor desta enzima (em concentração nanomolar) é conhecido até o momento. Considerando a importância da unidade de galactose e da função carboxila do ácido siálico para interações no sítio activo de TcTS, focamos na síntese de derivados de galactose com ácido succínico em diferentes posições do anel de açúcar e sua avaliação biológica em TcTS. Além disso, foi proposta uma busca por novos inibidores de TcTS através de técnicas de modelagem molecular, como triagem virtual baseada no sítio ativo da enzima. β -D-galactose e β -D-galactopiranosídeo de metila, disponíveis comercialmente, foram tratados com reagentes adequados para fornecer alguns intermediários com apenas uma hidroxila livre em poucas etapas. O tratamento destes compostos com anidrido succínico em piridina levou à formação dos respectivos derivados com ácido succínico em todas as posições do anel galactosídico. Após etapa de desproteção foi obtido apenas o derivado com ácido succínico na posição 4 (**85**), que foi testado em TcTS por ensaio fluorimétrico *in vitro* para avaliação de sua atividade inibitória. Adicionalmente, **85** foi testado em ensaios *in vitro* para avaliação de sua atividade tripanocida e citotóxica. De acordo com os ensaios biológicos, o composto **85** apresentou atividade inibitória promissora (56%) na concentração de 1,0 mM. Esse resultado preliminar foi importante para mostrar que esse tipo de derivado pode atuar como inibidor de TcTS e para orientar a síntese de novos derivados de galactose. O valor da atividade tripanocida foi inferior a 40% (0,5 mM) e não foi observada citotoxicidade na concentração de 0,5 mM. Os estudos de triagem virtual realizados neste trabalho através de simulações de “docking” resultaram na seleção das 50 melhores moléculas, baseada na orientação de maior pontuação, dentre 50.000 encontradas na base de dados diverset. O próximo passo envolve novos estudos para filtrar as moléculas mais promissoras para serem testadas em TcTS.

Palavras-chave: 1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. *trans*-Sialidase 3. Síntese de carboidratos 5. Modelagem molecular

ABSTRACT

DE ANDRADE, P. **Design, synthesis and biological activity evaluation of potential inhibitors of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enzyme.** 2012. 183 f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Chagas' disease, also known as American trypanosomiasis, is one of the most devastating tropical diseases and it is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The parasite expresses a cell surface enzyme, *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase (TcTS), responsible for the transference of sialic acids from host cells to terminal β -galactose molecules present on its glycoprotein surface. The sialylated glycoprotein molecules are involved in the attachment and subsequent penetration of the parasite into host cells. As a result, TcTS plays a key role in the recognition and invasion of host cells. Moreover, the lack of trans-sialidase in humans makes TcTS a potential drug target to be explored, however no strong inhibitors (at nanomolar range) of this enzyme are known to date. Considering the importance of galactose unit and the carboxyl function in sialic acid for interactions in the active site of TcTS, we have focused on the synthesis of galactose derivatives containing succinic acid in different positions of the sugar ring and on their biological evaluation against TcTS. In addition, we have proposed the search for new TcTS inhibitors applying molecular modeling techniques, like virtual screening based on the enzyme's active site. Commercially available α,β -D-galactose and methyl- β -D-galactopyranoside were treated with suitable reagents to afford some intermediates with just one free hydroxyl group in few steps. Treatment of these compounds with succinic anhydride in pyridine afforded derivatives thereof with succinic acid in all galactosidic ring positions. After deprotection step it was only obtained the derivative containing succinic acid at position 4 (**85**), which was tested in *in vitro* TcTS fluorimetric assay for evaluation of its inhibitory activity. In Addition, **85** was tested in *in vitro* assays for assessment of their trypanocidal activity and cytotoxic. According to the biological assays, compound **85** showed promising inhibitory activity (56%) at 1.0 mM concentration. This preliminary result was important both to show that this type of derivative can act as an inhibitor of TcTS and to guide the synthesis of new derivatives of galactose. The trypanocidal activity value was lower than 40% (0.5 mM) and there was no cytotoxicity at 0.5 mM concentration. The virtual screening studies performed in this work through docking simulations resulted in the selection of the 50 top-ranked molecules, based in the highest score orientation, among 50.000 found at diverset data base. The next step involves new studies to filter the most promising molecules to be tested against TcTS.

Keywords: 1. Chagas' disease 2. *Trypanosoma cruzi* 3. trans-Sialidase 4. Carbohydrate synthesis 5. Molecular modeling

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas e do parasita *Trypanosoma cruzi*

Em abril de 1909, Carlos Chagas (1878-1934) comunicou ao mundo científico a descoberta de uma nova doença, caracterizada como uma expressiva endemia rural em vários países latino-americanos (FIOCRUZ, 2009; AMATO NETO; PASTERNAK, 2009). Após 100 anos desde sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa um grande desafio à saúde pública na América Latina e durante décadas sua localização em áreas restritas e pobres ajudou a torná-la negligenciada e não atrativa para o desenvolvimento de fármacos (RASSI et al., 2009; THE LANCET, 2009).

As doenças parasitárias têm sido obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres, e são frequentemente chamadas de doenças negligenciadas, uma vez que afetam populações pobres e marginalizadas e para as quais não existe tratamento satisfatório (DIAS et al., 2009; VIK, 2009). A necessidade de novas alternativas terapêuticas é evidente, mas os investimentos em pesquisa e desenvolvimento de companhias farmacêuticas e de centros de pesquisas internacionais na busca de fármacos são insuficientes, por isso a doença de Chagas é uma das principais doenças negligenciadas do mundo (DIAS et al., 2009; KRAUS, 2009).

A doença de Chagas é considerada a terceira doença parasitária tropical de maior incidência no mundo, só superada pela malária e esquistossomose, e seu agente causador é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011). Sua transmissão em seres humanos e em outros mamíferos ocorre, principalmente, através das fezes contaminadas do inseto vetor *Triatoma infestans*, conhecido popularmente como “barbeiro” (REMME et al., 2006). Graças a medidas de controle sanitárias, a transmissão via *Triatoma infestans* foi interrompida no Brasil em 2006 (MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

