



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA E QUÍMICA MEDICINAL

FERNANDO RODRIGUES MATHIAS DA SILVA SEIXAS

**ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E PLANEJAMENTO
ESTRUTURAL DE NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES DA
ADENOSINA DEAMINASE**



Rio de Janeiro

2014

Fernando Rodrigues Mathias da Silva Seixas

ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E PLANEJAMENTO
ESTRUTURAL DE NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES DA
ADENOSINA DEAMINASE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientação:

Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga

Rio de Janeiro
Dezembro/2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Seixas, Fernando Rodrigues Mathias da Silva

Estudos de modelagem molecular e planejamento estrutural de novos candidatos a inibidores da adenosina deaminase / Fernando Rodrigues Mathias da Silva Seixas. -- Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas, 2014.

xx, 95 f. : il. ; 31 cm.

Orientador: Carlos Alberto Manssour Fraga

Dissertação (mestrado) – UFRJ, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2014.

Referências bibliográficas: f. 99- 110

1. Artrite Reumatoide - quimioterapia. 2. Artrite Reumatoide - patologia. 3. Artrite Reumatoide - terapia. 4. Inibidores Enzimáticos - química. 5. Adenosina Desaminase. 6. Inibidores de Adenosina Desaminase - uso terapêutico. 7. Inibidores de Adenosina Desaminase - administração & dosagem. 8. Simulação de Acoplamento Molecular – métodos. 9. Modelos Moleculares. 10. In vitro. 11. Farmacologia - Tese. I. Fraga, Carlos Alberto Manssour. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

“Estudos de Modelagem Molecular e Planejamento Estrutural de Novos Candidatos a Inibidores de Adenosina Deaminase”

**Fernando Rodrigues Mathias da Silva
Seixas**

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:



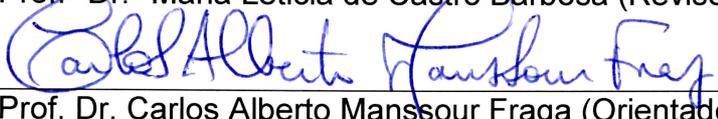
Prof.^a Dr.^a Gisele Zapata Sudo



Prof. Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna



Prof.^a Dr.^a Maria Leticia de Castro Barbosa (Revisora)



Prof. Dr. Carlos Alberto Manssour Fraga (Orientador)

Rio de Janeiro
05 de dezembro de 2014

A meus pais, Paulo Cesar e Mercedes,
por todo amor, carinho e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Carlos Alberto Manssour Fraga, pela orientação e ensinamentos ao longo desses 2 anos, pela franqueza e compreensão, e exemplo de excelente profissional.

Ao meu grande amigo e sócio Ricardo Amaral Remer, pelo constante incentivo, motivação e conversas científicas e filosóficas.

Ao Professor Eliezer J. Barreiro, pela oportunidade de ingressar no LASSBio e pela contribuição para minha formação profissional.

Aos Professores Lídia Moreira Lima, Helio de Mattos Alves, Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna e Maria Letícia Barbosa de Castro, pela convivência e contribuição à minha formação.

À banca examinadora pelo aceite do convite.

A Simone Villaça, Jorge Nogueira, Fabiana Navarro, Gabriela Santos e toda a equipe da Remer, Villaça & Nogueira pela torcida e incentivo ao longo desses anos.

À Margarida Marques, por me ensinar a ser mais sereno, mostrar que sempre posso fazer diferente, recomeçar quando necessário e a valorizar as conquistas diárias.

À minha família, Paulo Cesar, Mercedes, Maria Alice e Fredinho, pelo apoio, ajuda e companhia.

À minha querida Marta Giri e Marcelinha, por trazerem um colorido especial à minha vida.

À minha equipe atual, Marcus Paschoal, Louise Ferreira, Tainá Karklis, Monique Vieira, e aos que trabalharam comigo ao longo desses anos, Rodolfo Maia, Carla Conti, Livia Mattos, Larissa Yumi, Nathalie Guilmoto e Ludmila Kawakami, pelo comprometimento, profissionalismo e amizade.

Aos amigos do LASSBio, Thayssa Tavares, Roberta Tesch, Miguel Divino, Ciro G. Sá, Tiago Fernandes, Nailton Nascimento, Daniel Alencar, Daniel Amaral, Marina Amaral, Isabelle Karine, Juliana Vilachã, Thais Mara e Rosana Freitas, pelo convívio.

A meus amigos Guilherme Ji, Daniel Cardoso, Daniel Serra, Allan Guimarães, Samir Cavalcante, Ana Paula Carqueja, Janaina Soares, Camila Bandeira, Herbert Guedes, Tatiana Ferreira, Bruno Trotta e Enzo Macedo, pelo incentivo e amizade.

A meus colegas de pós-graduação, Bruna Quaresma, Renata Januário, Carlos Cândido, Natasha Paixão e Liviane Barbosa, pelo companheirismo.

Ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal.

Quando o aluno está pronto então surge o mestre.

~ Provérbio Budista ~

RESUMO

SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias da Silva. **ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DE NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES DA ADENOSINA DEAMINASE**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências, em Farmacologia e Química Medicinal – Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014).

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune, com caráter inflamatório, que afeta principalmente as articulações sinoviais (diartroses), sendo capaz de levar a uma perda substancial da mobilidade e função das mesmas se não tratada de forma adequada. As terapias disponíveis, tanto convencionais quanto biológicas, falham ou produzem efeitos apenas parciais. Nesse contexto, estudos sobre a fisiopatologia da AR buscam proporcionar novas alternativas terapêuticas. O bloqueio da metabolização da adenosina pela inibição da adenosina deaminase humana (ADA), e consequente aumento da concentração de adenosina no fluido sinovial foi a opção escolhida neste estudo. A ADA é uma enzima ideal para estudos mecanísticos por ser pequena, monomérica, facilmente purificada e catalisar uma reação relativamente simples com extrema eficiência. O presente trabalho teve como objetivos: a comparação dos perfis de reconhecimento molecular dos inibidores conhecidos da ADA, eleição dos grupos funcionais farmacofóricos por meio de estudos de ancoramento molecular, seguido de testes em um protocolo de inibição competitiva, por meio de ensaio espectrofotométrico. O modelo computacional aplicado reproduziu os dados experimentais, e permitiu extrair informações acerca das principais interações envolvidas dos inibidores pela ADA, as quais foram aplicadas no planejamento racional de novos ligantes estruturalmente simples. Estudos de ancoramento molecular com a enzima alvo confirmaram seu potencial como inibidores da ADA. O modelo experimental mostrou-se capaz de monitorar a catálise e inibição da ADA. Aponta-se como perspectivas do presente trabalho a síntese dos compostos propostos, verificação de atividade inibitória na ADA humana *in vitro*, e a validação de sua eficácia em modelos de doença.

Palavras-chave: artrite reumatoide, adenosina, ADA, modelagem molecular, ancoramento molecular.

ABSTRACT

SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias da Silva. **ESTUDOS DE MODELAGEM MOLECULAR E PLANEJAMENTO ESTRUTURAL DE NOVOS CANDIDATOS A INIBIDORES DA ADENOSINA DEAMINASE**. Rio de Janeiro, 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências, em Farmacologia e Química Medicinal – Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory autoimmune disease, affecting mainly synovial joints (diarthrosis), being able to lead to substantial movement and function losses if not treated correctly. The available therapies, both conventional and biological, fail or produce partial effects. In this context, studies on the physiopathology of RA aim to provide new therapeutical alternatives. The halting of adenosine metabolism by the inhibition of human adenosine deaminase (ADA), followed by increase of adenosine concentration in the synovial fluid was the chosen strategy in the present study. ADA is an ideal enzyme for mechanistic studies due to its small size, monomeric structure, ease of purification and catalysis of a relatively simple reaction with extreme efficiency. The present study compared the molecular recognition profiles of ADA inhibitors, elected pharmacophoric functional groups for ADA inhibition by means of docking studies, followed by tests in a spectrophotometric competitive inhibition assay. The computational model designed was able to reproduce experimental data, and allowed the extraction of information about the main interactions involved in molecular recognition profiles of ADA inhibitors, which were then applied in the rational design of structurally simple inhibitors. Docking studies confirmed its potential as ADA inhibitors. The experimental model was able to monitor ADA catalysis and inhibition. The perspectives of this study include the synthesis of the proposed compounds and *in vitro* assay of its inhibitory activity in ADA, along with validation of its efficacy in disease models.

Keywords: Rheumatoid arthritis, adenosine, ADA, molecular modeling, docking.

Lista de Figuras

Figura 1 - Interações genético-ambientais promovem perda da tolerância a auto-proteínas que contém resíduos de citrulina, os quais são gerados por uma modificação pós-traducional. (Adaptado de McINNES & SCHETT, 2011)	23
Figura 2 - Processos imunes adaptativos e inatos que ocorrem nas articulações durante a AR. (Adaptado de McINNES & SCHETT, 2011)	25
Figura 3 – Estrutura dos DMARDs comumente prescritos na diminuição da velocidade da destruição da cartilagem e ossos na AR	32
Figura 4 - Estruturas de fostamatinibe sódico (8) e tofacitinibe (9)	37
Figura 5 - Estruturas do ácido acetil salicílico (10) e salicilato de sódio (11)	39
Figura 6 - Estrutura cristalográfica da ADA humana (COD PDB: 3IAR), evidenciando a estrutura de barril (β/α) ₈ e o átomo de Zn ²⁺	41
Figura 7 - Formas fechada (esquerda) e aberta (direita) do sítio ativo da ADA humana, e respectivos subsítios S0, F0, F1 e F2 (Adaptado de TAKAYOSHI et al., 2005)	41
Figura 8 – Mecanismo catalítico proposto para a ADA humana (Adaptado de WU et al., 2010)	42
Figura 9 – Estrutura dos principais inibidores da ADA humana	43
Figura 10 - Fármacos desenvolvidos a partir de SBDD	45
Figura 11 - Exemplos de estruturas pertencentes aos grupos 1A, 1B, 2A, 2B, 3A e 3B	48
Figura 12 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério da adição/remoção de substituintes	49
Figura 13 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério da troca de substituintes	49
Figura 14 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério do isosterismo	50
Figura 15 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério da adição de metileno em série homóloga	50
Figura 16 - Estrutura dos compostos testados como inibidores da ADA	52
Figura 17 - Distâncias e ângulos das ligações dos átomos pesados da molécula de adenosina, com um desvio padrão de 0,003Å (adaptado de LAI & MARSH, 1972)	53

Figura 18 - Exemplo de comparação estrutural dos compostos do grupo 1B, no qual estão assinalados em verde os compostos estruturalmente semelhantes, bem como o critério de semelhança utilizado	58
Figura 19 – Imagem da planilha contendo as duplas obtidas identificadas pela comparação estrutural, respectivos valores de pKi e diferença encontrada, estando valores maiores do que 2 realçados em vermelho	59
Figura 20 - Estrutura dos compostos CHEMBL279149 e CHEMBL17825, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	60
Figura 21 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17825 (amarelo) e CHEMBL279149 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	61
Figura 22 - Estrutura dos compostos CHEMBL279149 e CHEMBL17825, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	62
Figura 23 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17825 (amarelo) e CHEMBL276360 (ciano), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	64
Figura 24 - Estrutura dos compostos CHEMBL128787 e CHEMBL17638, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	65
Figura 25 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17638 (amarelo) e CHEMBL128787 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	66
Figura 26 - Mapa da densidade eletrônica de CHEMBL128787 (esquerda) e CHEMBL17638 (direita), mostrando a variação da densidade eletrônica no átomo de nitrogênio piridínico e no átomo de nitrogênio do grupo amino	67
Figura 27 - Estrutura dos compostos CHEMBL115824 e CHEMBL604599, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	68
Figura 28 - Diferença do modo de interação de CHEMBL115824 (amarelo) e CHEMBL604599 (ciano), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	69
Figura 29 - Estrutura dos compostos CHEMBL17822 e CHEMBL18838, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	70
Figura 30 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17822 (amarelo) e CHEMBL18838 (ciano), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.....	71

Figura 31 - Estrutura dos compostos CHEMBL1651380 e CHEMBL604016, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	72
Figura 32 - Diferença do modo de interação de CHEMBL1651380 (magenta) e CHEMBL604016 (amarelo), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	73
Figura 33 - Estrutura dos compostos CHEMBL104714 e CHEMBL322906 com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	75
Figura 34 - Diferença do modo de interação de CHEMBL104714 (amarelo) e CHEMBL322906 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	76
Figura 35 - Estrutura dos compostos CHEMBL1181766 e CHEMBL364717, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	77
Figura 36 - Diferença do modo de interação de CHEMBL1181766 (amarelo) e CHEMBL364717 (magenta) e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	78
Figura 37 - Estrutura dos compostos CHEMBL296435 e CHEMBL321338, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular	79
Figura 38 - Diferença do modo de interação de CHEMBL296435 (amarelo) e CHEMBL321338 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana	80
Figura 39 - Sítio ativo da ADA humana com os aminoácidos envolvidos nas interações produtivas para o efeito inibitório, observadas no presente trabalho	81
Figura 40 - Comparação entre o modo de interação teórico do composto 1-(2-hidroxi-3-nonila)-4-carboxamida-imidazol (amarelo) do composto 1-(2-hidroxi-3-nonila)-imidazol (ciano) com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas	84
Figura 41 - Modo de interação do EHNA no sítio ativo da ADA bovina (COD PDB: 2Z7G), com os principais resíduos de aminoácidos em destaque e a estrutura do inibidor EHNA (14)	85
Figura 42 - Ligantes propostos para o presente estudo, todos com um anel pirazólico funcionalizado com o grupo carboxamida e substituintes alquila, hidroxi-alquila, benzila e fenetila	85

Figura 43 - Modo de interação teórico de FMS-01 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas	87
Figura 44 - Modo de interação teórico de FMS-02, antípoda <i>S</i> (magenta) e antípoda <i>R</i> (amarelo), com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas	88
Figura 45 - Modo de interação teórico de FMS-03 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas	89
Figura 46 - Modo de interação teórico de FMS-04 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas	90
Figura 47 - Comparação entre o composto proposto (FMS-03) e os compostos testados (FMS-03.1 e FMS-03.2) para o presente estudo	91
Figura 48 - Modo de interação teórico de FMS-03.1 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas	91
Figura 49 - Modo de interação teórico de FMS-03.2 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas	92
Figura 50 - Comparação das poses de FMS-03 (amarelo), FMS-03.1 (ciano) e FMS-03.2 (magenta) com o sítio ativo da ADA humana	93
Figura 51 - Cinética da ADA com adenosina como substrato, mostrando as velocidades obtidas para as concentrações de 5, 10, 15, 25, 40, 50, 60, 75, 80, 100, 150 μM	94
Figura 52 - Plotagem do duplo-recíproco a partir dos valores obtidos na cinética enzimática, para obtenção dos valores de K_m e V_{max} da ADA humana	95
Figura 53 - Plotagem do duplo-recíproco da cinética de inibição da ADA com EHNA como inibidor nas concentrações de 0, 15, 25 e 40 nM, e respectivas regressões lineares	96
Figura 54 - Plotagem dos coeficientes angulares obtidos a partir da cinética de inibição da ADA com EHNA versus a concentração de EHNA utilizada	97

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Valores médios obtidos para o comprimento (em Å) para cada tipo de ligação dos átomos pesados da molécula de adenosina	53
Tabela 2 - Valores de RMSD do composto 2'-desoxiadenosina obtidos para cada função de ranqueamento do programa GOLD 5.2	54
Tabela 3 - Quantidade de compostos relacionados à ADA obtidos na busca do ChEMBL, classificados por grupo estrutural	57
Tabela 4 - Compostos analisados e respectivos valores de pKi, pontuação e módulo da diferença de pKi	59
Tabela 5 - Compostos e respectivos valores de pKi e módulo da diferença	82

Lista de Quadros

Quadro 1 - Genes candidatos com polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) ligados à AR e sua potencial função na patogênese. (Adaptado de McINNES & SCHETT, 2011)21

Lista de abreviaturas e símbolos

- ACPA – Anticorpo anti-proteína citrulinada
- ACR – *American College of Rheumatology* (Faculdade Americana de Reumatologia)
- ADA – Adenosina deaminase
- ADAMTS – Desintegrina e metaloprotease com domínios do tipo trombospondin-1
- ADGFs – Fatores de crescimento de ADA
- AICAR – Aminoimidazol-carboxamida-ribonucleotídeo transformilase
- AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais
- AMP – Adenosina monofosfato
- APCs – Células apresentadoras de antígenos
- AR – Artrite reumatóide
- CRP – Proteína C reativa
- CTLA4 – Antígeno 4 associado ao linfócito T-citotóxico
- DAMP – Padrão molecular associado a danos
- dATP 2-desoxiadenosina trifosfato
- DMARDs – Fármacos anti-reumáticos modificadores da doença
- EHNA Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina
- ESR – Taxa de sedimentação de eritrócito
- EULAR – *European League Against Rheumatism* (Liga Européia contra Reumatismo)
- FcR – Receptor Fc
- FcεRI – Receptor IgE de alta afinidade
- FGF – Fator de crescimento de fibroblasto
- FLS – Sinoviócitos do tipo fibroblastos
- FR – Fator reumatóide
- GM-CSF – Fator de estimulação de colônias granulócito-macrófago
- GTPase – Guanosina trifosfatase
- HA – Ácido hialurônico
- HCQ – Hidroxicloroquina
- HSP – Proteína de choque térmico
- IFN- α/β – Interferon- α/β ,
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-12 – Interleucina 12
IL-13 – Interleucina 13
IL-15 – Interleucina 15
IL-17 – Interleucina 17
IL-17A – Interleucina 17A
IL-18 – Interleucina 18
IL-21 – Interleucina 21
IL-23 – Interleucina 23
IL-6 – Interleucina 6
JAKs – Janus cinases
MAPKs – Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
MMP – Metaloproteinasas de matriz
MTX – Metotrexato
NF- κ B – Fator nuclear κ B
PADI4 - Peptidil arginina deiminase tipo IV
PAMP – Padrão molecular associado a patógenos
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
RMSD desvio médio quadrático
SBDD *Structure Based Drug Design* (desenho de fármacos baseado na proteína)
SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único
SSZ – Sulfasalazina
sTNF – Forma solúvel do TNF- α
Syks – Tirosina cinases do baço
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
Th0 – Linfócito T não-iniciado
Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1
Th17 – Linfócito T auxiliar tipo 17
TIMPs - Inibidores tissulares de metaloproteinasas
TLR – Receptores do tipo Toll
tmTNF- α – TNF- α transmembranar
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Definição de artrite reumatóide.....	19
1.2 Epidemiologia.....	19
1.3 Patogênese da doença.....	20
1.3.1 Fatores genéticos e ambientais.....	20
1.3.2 Processos imunológicos e inflamação sinovial.....	24
1.3.3 Danos estruturais.....	26
1.3.4 Consequências sistêmicas da AR.....	27
1.4 Diagnóstico.....	27
1.5 Tratamento.....	30
1.5.1 DMARDs.....	31
1.5.2 – Biofármacos.....	33
1.5.2.1 Moduladores da atividade de citocinas.....	33
1.5.2.2 Inibidores de ativação celular.....	35
1.5.2.3 Pequenas moléculas que atuam em vias de sinalização intracelular específicas.....	36
1.6 A escolha da via da adenosina para estudo na AR.....	37
1.7 Adenosina Deaminase.....	39
1.7.1 Características estruturais da ADA.....	40
1.7.2 Características catalíticas da ADA.....	41
1.7.3 Inibidores da ADA.....	42
1.8 Modelagem Molecular.....	43
2 OBJETIVOS	46
3 METODOLOGIA	46
3.1 Desenho e validação da metodologia de minimização dos ligantes.....	46
3.2 Validação da Metodologia de ancoramento molecular.....	46
3.3 Seleção de Compostos Semelhantes a partir de Banco de Dados e Análise das Interações.....	47
3.4 Estudos de cinética enzimática.....	50
3.4.1 Obtenção dos parâmetros da ADA humana.....	51
3.4.2 Ensaio de inibição da ADA humana.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

4.1 Desenho e validação da metodologia de minimização dos ligantes.....	52
4.2 Validação da metodologia de ancoramento molecular.....	54
4.3 Seleção de compostos semelhantes a partir de banco de dados e análise das interações....	54
4.3.1 Termodinâmica das interações.....	55
4.3.2 Interações favoráveis e produtivas.....	55
4.3.3 Análise comparativa.....	57
4.3.3.1 ChEMBL279149 vs ChEMBL17825.....	60
4.3.3.2 ChEMBL276360 vs ChEMBL17825.....	62
4.3.3.3 ChEMBL128787 vs ChEMBL17638.....	64
4.3.3.4 ChEMBL115824 vs ChEMBL604599.....	67
4.3.3.5 ChEMBL17822 vs ChEMBL18838.....	70
4.3.3.6 ChEMBL1651380 vs ChEMBL604016.....	72
4.3.3.7 ChEMBL104714 vs ChEMBL322906.....	74
4.3.3.8 ChEMBL1181766 vs ChEMBL364717.....	76
4.3.3.9 ChEMBL296435 vs ChEMBL321338.....	78
4.3.4 Análise da relevância da pontuação.....	81
4.4 Desenho dos Ligantes.....	82
4.4.1 Ancoramento molecular de FMS-01.....	86
4.4.2 Ancoramento molecular de FMS-02.....	87
4.4.3 Ancoramento molecular de FMS-03.....	88
4.4.4 Ancoramento molecular de FMS-04.....	89
4.4.5 Ancoramento molecular de FMS-03.1.....	91
4.4.6 Ancoramento molecular de FMS-03.2.....	92
4.5 Cinética Enzimática.....	94
4.5.1 Obtenção de Km e Vmax.....	94
4.5.2 Ensaios de inibição.....	95
4.5.2.1 Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) (14)	95
4.5.2.2 FMS-03.1 e FMS-03.2.....	97
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	98
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de artrite reumatóide

Reumatismo é o nome genérico de diversas afecções caracterizadas por inflamações dolorosas dos músculos, das articulações ou das estruturas do tecido conjuntivo, tais como tendões e ligamentos (FERREIRA, 1999).

A artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune, com caráter inflamatório, que afeta diversos tecidos e órgãos, afetando principalmente as articulações sinoviais (diartroses), sendo capaz de levar a uma perda substancial da mobilidade e função das mesmas se não tratada de forma adequada, bem como complicações sistêmicas, incluindo cardiovascular, pulmonar, psicológica e óssea (MA & XU, 2013).

A inflamação da articulação causa um aumento do volume das células sinoviais, produção de auto-anticorpos (fator reumatóide (FR) e anticorpo anti-proteína citrulinada (ACPA)), uma produção excessiva de fluido sinovial e o desenvolvimento de tecido fibroso no local, culminando com a destruição da cartilagem articular e, em alguns casos, anquilose, que é a fusão das articulações (HOLERS, 2013).

1.2 Epidemiologia

A AR afeta principalmente adultos na faixa dos 20 a 40 anos, sendo mais freqüente em mulheres e possui uma prevalência mundial de 0,3% a 1%¹.

Explicações moleculares para esse fenômeno começam a surgir de modelos animais de inflamação, que estabelecem um elo entre o eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e a produção de citocinas. O sistema nervoso central está envolvido na regulação imune e homeostase, e interações neuroimunológicas regulam o desenvolvimento da doença em modelos murinos de artrite. Tais efeitos parecem operar de forma local, pela expressão de diversos neurotransmissores nas células da sinóvia, e de forma central, na qual citocinas sofrem uma regulação crescente no hipotálamo durante a inflamação periférica (CAPELLINO et al., 2010).

Uma vez diagnosticada, dentro de 10 anos pelo menos 50% dos pacientes se tornam incapazes de manter sua atividade produtiva¹.

Os dados epidemiológicos de AR no Brasil são escassos, não sendo, portanto possível ter um perfil detalhado sobre a prevalência da doença. Um estudo feito em 2004, restrito ao

¹ Disponível em: <http://www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/> - Acesso em: 29/10/2014

município de Montes Claros, MG, mostrou que a AR atinge 0,46% da população (SENNA et al., 2004).

1.3 Patogênese da doença

Por ser uma doença autoimune, a apresentação de um antígeno a um indivíduo suscetível é o gatilho da AR. No entanto, a ciência atualmente possui muito mais conhecimento sobre os efeitos causados no organismo do que sobre os agentes causadores da doença, também chamados de estímulos artritogênicos. Acredita-se que tanto fatores ambientais e agentes infecciosos, quanto substâncias endógenas e fatores genéticos contribuam para o desenvolvimento da AR.

1.3.1 Fatores genéticos e ambientais

Diversos achados científicos sugerem que as respostas autoreativas imunes adaptativas humanas estejam relacionadas, como a predisposição de mecanismos de apresentação de antígenos, seleção do repertório de células T e mimetismo de sequências peptídicas que conferem susceptibilidade. Uma análise genômica mundial deixa claro que fatores regulatórios imunes suportam o aparecimento da doença (DONNELLY et al., 2007). A associação do locus (HLA)-DRB1 foi confirmada em pacientes positivos para RF ou ACPA: alelos que possuem um padrão de aminoácidos comum (QKRAA) na região do HLA-DRB1, denominada de região do “epítipo compartilhado”, conferem uma particular susceptibilidade (GREGERSEN et al., 1987).

Diversos outros alelos de risco em AR positiva para ACPA foram identificados e possuem função relacionada com a regulação imune, conforme Quadro 1, mostrando que genes relacionados com a ativação de células T e com a via de NF- κ B estão relacionados com a patogênese da AR.

Gene e via candidatos	SNP locus	Função Relevante para a Patogênese
Ativação de células T		
<i>HLA-DRB1</i>	6p21	O alelo HLA-DRB1 (também conhecido como epítipo compartilhado) está envolvido na apresentação de antígenos baseado em moléculas pelo MHC e é responsável pela seleção de auto-peptídeos e repertório de células T; primeiro a ser descoberto e considerado o elo genético mais importante com artrite reumatoide
<i>PTPN22</i>	1p13.2	Tirosina-fosfatase citoplasmática, específica de linfócitos, envolvida na regulação do limiar de ativação de linfócitos; segundo elo genético descrito para artrite reumatoide
<i>AFF3</i>	2q11.2	Fator de transcrição para desenvolvimento linfoide
<i>CD28</i>	2q33.1	Molécula co-estimulatória para ativação de células T
<i>CD40</i>	20q13.12	Molécula co-estimulatória que melhora as interações entre células T e B e aumenta a produção de auto-anticorpos
<i>CTLA4</i>	2q33.2	Supressor da co-estimulação que regula as interações entre as células T e as células apresentadoras de antígeno
<i>IL2RA</i>	10p15.1	Receptor de alta-afinidade para interleucina-2 em subconjuntos de linfócitos
<i>IL2</i>	4q27	Citocina que regula a ativação de células T, em especial células T reguladoras
<i>IL-21</i>	4q27	Citocina que regula a diferenciação de células T, em particular a células Th17, e ativação de células B
<i>PRKCQ</i>	10p15.1	Membro da família de proteína cinase C que regula ativação de células T e macrófagos
<i>STAT4</i>	2q32.3	Transdutor de sinais de citocinas que regulam a proliferação, sobrevivência e diferenciação de linfócitos
<i>TAGAP</i>	6q25.3	Enzima Rho-GTPase envolvida na ativação de células T
Via do NF-κB		
<i>REL</i>	2p16.1	Proto-oncogene membro da família do NF-κB que regula ativação e sobrevivência de linfócitos
<i>TNFAIP3</i>	6q23.3	Proteína sinalizadora e regulador negativo da ativação de NF-κB induzida por TNF-α
<i>TRAF1</i>	9q33.1	Regulador da sinalização da superfamília de receptores de TNF-α
Outras Vias		
<i>BLK</i>	8p23.1	Tirosina cinase B-linfoide envolvida na sinalização dos receptores e desenvolvimento das células B
<i>CCL21</i>	9q13.3	Quimiocina envolvida na formação do centro-germinal
<i>FCGR2A</i>	1q23.2	Receptor Fc com baixa afinidade a IgG que regula a ativação de macrófagos e neutrófilos e depuração de imuno-complexos
<i>PADI4</i>	1p36.2	Enzima que converte arginina a citrulina, criando auto-antígenos na artrite reumatoide
<i>PRDM1</i>	6q21	Proteína que age com um supressor da expressão do gene do β-interferon
<i>TNFRSF14</i>	1p36.32	Membro da superfamília de receptores de TNF-α com atividade pro-inflamatória

Quadro 1 - Genes candidatos com polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ligados à AR e sua potencial função na patogênese. (Adaptado de McINNES & SCHETT, 2011).

O fumo e outras formas de estresse bronquiolar, como exposição à sílica, aumentam o risco de AR em indivíduos com alelos HLA-DR4 suscetíveis (SYMMONS et al., 1997). Além disso, o fumo atua de maneira sinérgica com alelos HLA-DRB1 aumentando o risco de desenvolver ACPA (KLARESKOG et al., 2006). Essas observações mostram que agentes que promovem estresse pulmonar podem promover modificações traducionais via peptidil

arginina deiminase tipo IV (PADI4), que resulta em alteração qualitativa e quantitativa das proteínas citrulinadas da mucosa.

A Figura 1 mostra a progressão em várias etapas e desenvolvimento da AR. A resposta anticitrulínica pode ser detectada em compartimentos contendo células T e B, sendo provavelmente iniciada em tecidos linfoides secundários ou medula óssea. Em seguida, a resposta inflamatória ocorre nas articulações por um mecanismo ainda não muito bem compreendido. A sinovite é iniciada e segue em ciclos de retro-alimentação, promovendo distúrbios sistêmicos que compõem o quadro clínico da AR.

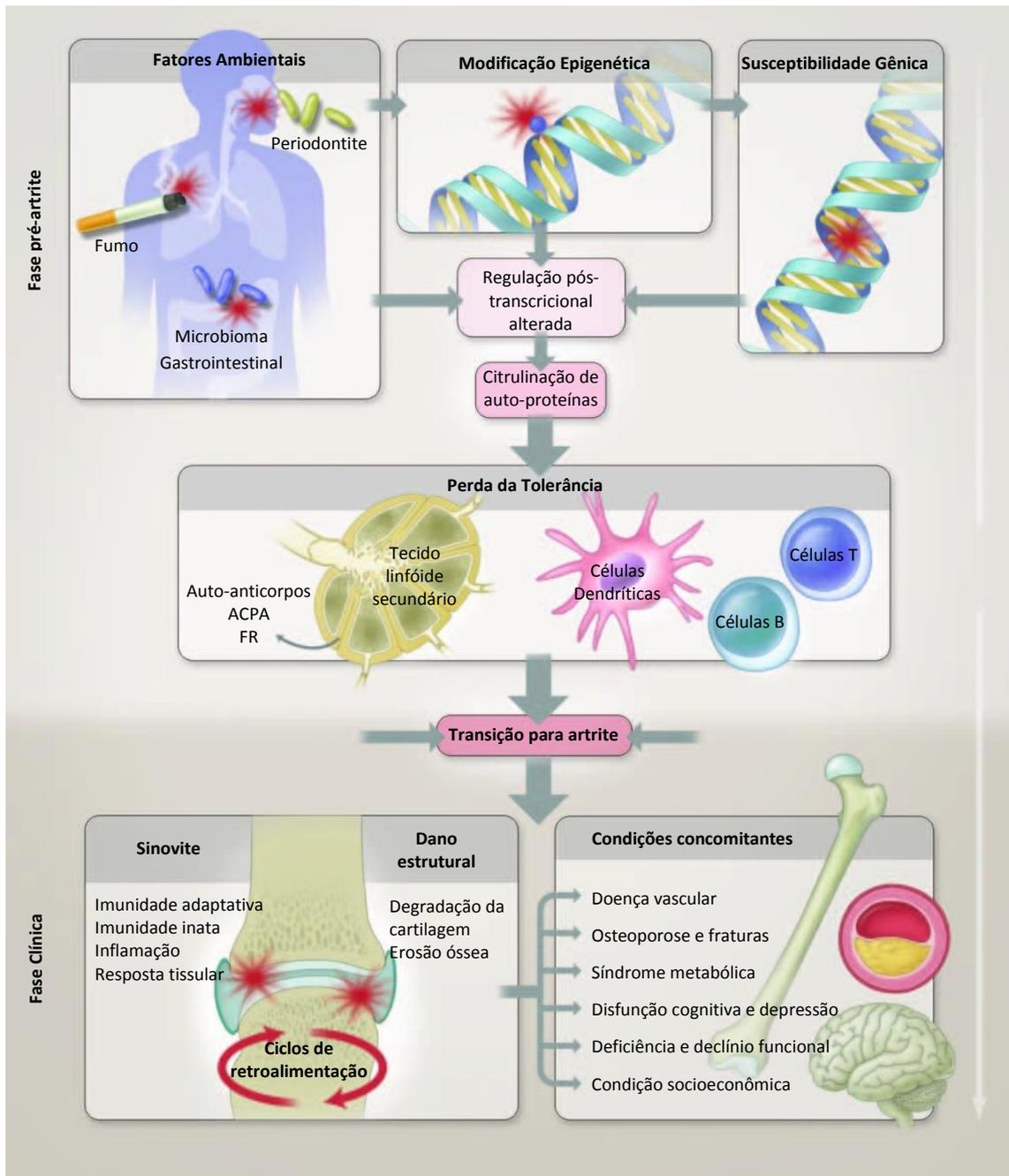


Figura 1 - Interações genético-ambientais promovem perda da tolerância a auto-proteínas que contém resíduos de citrulina, os quais são gerados por uma modificação pós-traducional. (Adaptado de McINNES & SCHETT, 2011).

Postula-se ainda que a perda da tolerância imunológica, ou seja, situação onde o organismo passa a produzir uma resposta imune até então inexistente, possa também estar associada às doenças periodontais, uma vez que *Porphyromonas gingivalis* expressa PADI4, que, conforme mencionado anteriormente, é capaz de promover a citrulinação de proteínas de mamíferos (WEGNER et al. 2010).

A perda de tolerância a tais epítomos gera a produção de ACPA. Agentes infecciosos (vírus Epstein-Barr, citomegalovirus, *E. coli*), bem como seus produtos (proteínas choque-térmico) estão ligados à AR há muito tempo, porém por um mecanismo ainda desconhecido. Acredita-se que a formação de complexos imunes durante a infecção possa induzir a produção do FR. Um último fator que se acredita estar envolvido nessa perda de tolerância é o microbioma gastrointestinal, pois foi mostrado que assinaturas bacterianas específicas foram capazes de promover a produção de FR (SCHER et al., 2010).

A razão pela qual essa perda de tolerância está ligada a uma inflamação localizada nas articulações ainda é desconhecida. Acredita-se que ocorra contribuição de mecanismos microvasculares locais, neurológicos e biomecânicos (SCHER et al., 2010).

1.3.2 Processos imunológicos e inflamação sinovial

As interações dependentes de co-estimulação entre células dendríticas, células T e células B ocorrem primariamente no linfonodo, gerando uma resposta auto-imune à auto-proteínas contendo citrulina (NADKARNI et al., 2007).

A resposta imune adaptativa, produzindo auto-anticorpos, é uma peça central da patogênese inicial da AR. Citocinas como TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 and IL-23, secretadas por macrófagos e células dendríticas, criam um ambiente que favorece a diferenciação das células Th0 em células Th17 e o aumento nas concentrações de TNF- α , suprimindo assim a diferenciação em células T regulatórias, criando um desequilíbrio na homeostase local e gerando um ambiente inflamatório. A sinovite ocorre quando leucócitos se infiltram e se acumulam no líquido sinovial, principalmente por meio de migração ao invés de proliferação local, migração esta facilitada pela expressão de moléculas de adesão (ativação endotelial) nos microvasos sinoviais. Essas mudanças na arquitetura do líquido sinovial, somadas à ativação local de fibroblastos, permitem a instalação do cenário inflamatório da AR (NADKARNI et al., 2007).

As interações entre leucócitos, fibroblastos sinoviais, condrócitos e osteoclastos, em conjunto com seus produtos moleculares oriundos do dano tissular estimulam a continuidade do processo inflamatório e participam da fase crônica da AR (McINNES & SCHETT, 2011).

A Figura 2 resume essas interações e as principais citocinas envolvidas no processo inflamatório da AR.

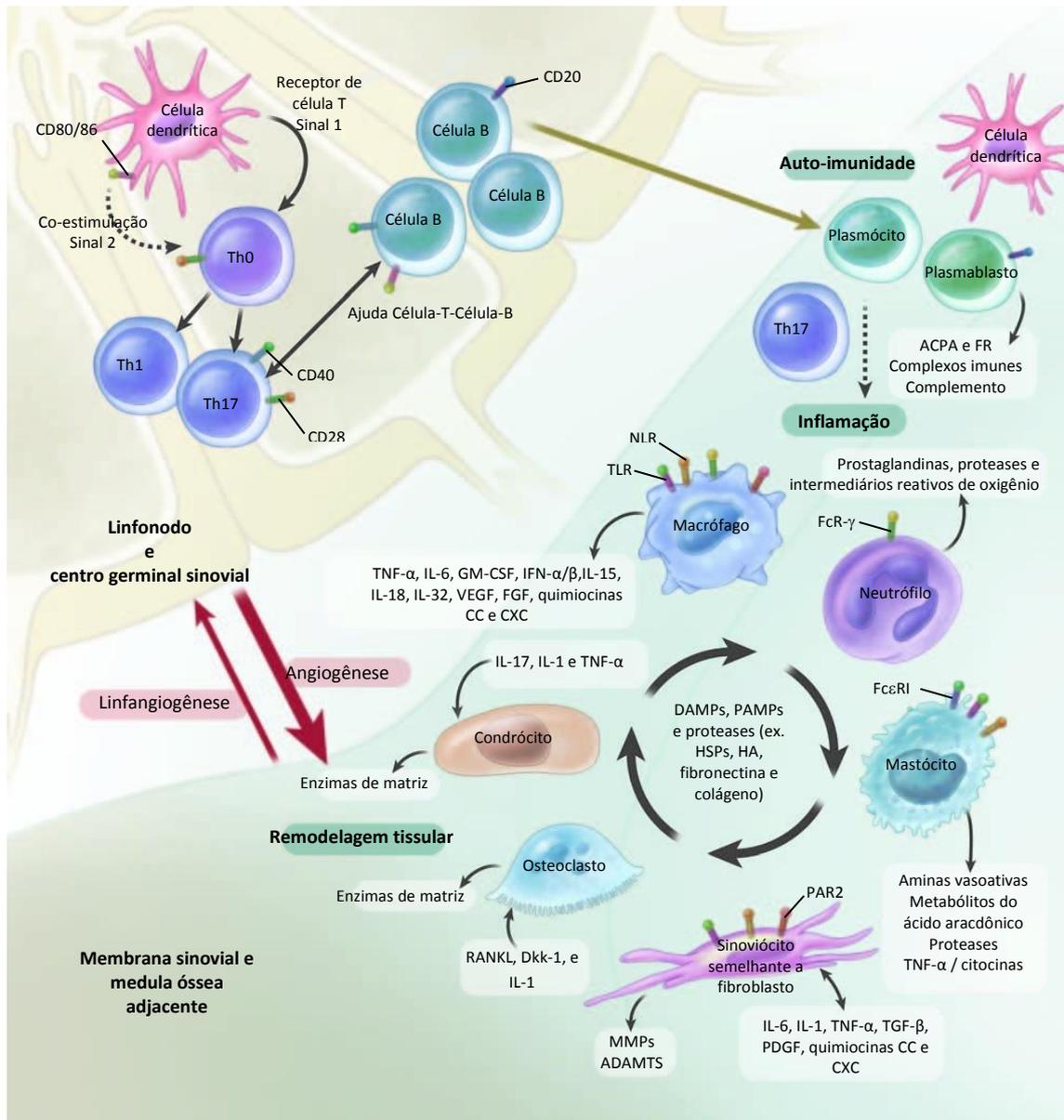


Figura 2 - Processos imunológicos adaptativos e inatos que ocorrem nas articulações durante a AR. (Adaptado de McINNES & SCHETT, 2011).

Diversas células efetoras inatas, como macrófagos, mastócitos e células NK, são encontradas na membrana sinovial, enquanto neutrófilos residem no fluido sinovial. Os macrófagos são os principais causadores da sinovite, agindo através da liberação de citocinas (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-23), espécies reativas de oxigênio, prostanoídes e pela apresentação de antígenos (HARINGMAN et al., 2005). Os macrófagos são ativados por citocinas, interações com células T, complexos imunes, partículas de lipoproteínas e pelas proteases do microambiente (LIEW & McINNES, 2001). Neutrófilos contribuem para o quadro de sinovite através da produção de prostaglandinas, proteases e espécies reativas de oxigênio (CASCÃO et al., 2010).

O perfil de citocinas do líquido sinovial varia com o tempo e com a progressão da doença. Estágios iniciais possuem um perfil que compreende a expressão de IL-4, IL-13 e IL-15 (RAZA et al., 2005). TNF- α possui um papel fundamental por ativar a expressão de citocinas e quimiocinas, ativar a expressão de moléculas de adesão, promover angiogênese, suprimir a diferenciação em células T regulatórias e induzir dor (FELDMANN et al., 1996). Interleucina-6 aumenta a ativação de leucócitos locais e produção de auto-anticorpos, ao mesmo tempo que modula efeitos sistêmicos que promovem respostas de fase aguda, anemia, disfunção cognitiva e desregulação do metabolismo de lipídios. A família de citocinas da interleucina-1 (1 α , 1 β , 18 e 33) é abundantemente expressa na AR, promovendo a ativação de leucócitos, células endoteliais, condrócitos e osteoclastos (McINNES & SCHETT, 2007; BRENNAN & McINNES, 2008).

1.3.3 Danos às articulações

Uma membrana sinovial expandida é o maior contribuinte para os danos à cartilagem na AR. A reduzida expressão de lubricina reflete a perda do poder de proteção da cartilagem, promovendo a adesão e invasão de sinoviócitos do tipo fibroblastos (FLS), que sintetizam metaloproteinases de matriz, degradando a matriz cartilaginosa (RHEE et al., 2005; SABEH et al., 2010).

A reversão dos danos causados é muito limitada, tanto pelo baixo poder de regeneração da cartilagem quanto pela incapacidade de reverter essa cascata de eventos por inibidores enzimáticos endógenos, os inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs). Citocinas sinoviais e intermediários reativos de nitrogênio induzem os condrócitos a apoptose, principal mecanismo fisiológico regulador da matriz cartilaginosa. Esse processo leva à destruição da cartilagem, característica da AR.

A inflamação prolongada e crescente é a principal causa das erosões ósseas (VISSER et al., 2002). As citocinas sinoviais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 promovem a diferenciação e ativação de osteoclastos, os quais possuem um maquinário enzimático capaz de destruir tecidos mineralizados, levando à formação de fendas de reabsorção profundas que serão preenchidas com tecido inflamatório.

Fatores mecânicos tornam determinadas articulações mais propensas à erosão, como os segundos e terceiros metacarpos (McGONALE et al., 2009). A penetração da região cortical do osso garante acesso do líquido sinovial à medula óssea, causando assim

inflamação da medula, conhecida como osteíte. Os ossos que sofrem erosão por conta da AR não mostram sinais de reparo, como em outras artropatias inflamatórias.

1.3.4 Consequências sistêmicas da AR

A AR não fica restrita às articulações, e está associada a um risco maior de doenças cardiovasculares e eventos cerebrovasculares (SOLOMON et al., 2003). A inflamação também é capaz de afetar o cérebro (causando fadiga e uma redução da função cognitiva), o fígado (causando uma resposta elevada na fase aguda e anemia na fase crônica), pulmões (causando doenças inflamatórias e fibróticas), glândulas exócrinas (causando síndrome secundária de Sjögren), músculos (causando sarcopenia) e ossos (causando osteoporose). A atividade inflamatória da AR está associada a um maior risco de linfoma (SMITTEN et al., 2008), assim como câncer de pulmão, independente do paciente ser fumante, sendo que a causa desta última condição possa estar ligada aos efeitos extra-articulares bem conhecidos sobre a remodelagem fibrótica do tecido pulmonar intersticial.

As vias inflamatórias que estão relacionadas a estes efeitos incluem citocinas (IL-6 e TNF- α - capazes de tornar os tecidos adiposo e muscular resistentes à insulina, resultando em uma síndrome “metabólica inflamatória”), reagentes da fase aguda, complexos imunes e alteração na distribuição de partículas lipídicas (capazes de aumentar a ativação do endotélio e tornar as placas de ateroma instáveis) (SATTAR & McINNES, 2005).

1.4 Diagnóstico

É possível diminuir a progressão da AR caso ela seja diagnosticada precocemente, idealmente 6 meses antes do aparecimento dos sintomas, e o tratamento iniciado rapidamente.

O primeiro grande avanço no diagnóstico da AR ocorreu em 1947, quando um técnico que possuía AR e trabalhava no laboratório do Dr. Harry Rose, observou que seu próprio soro aglutinava de forma excessiva. O Dr. Rose então sugeriu que essa aglutinação excessiva poderia ser decorrente da artrite. Baseado nessa sugestão, o reumatologista Charles Ragan estudou e desenvolveu o teste de aglutinação de célula de ovelha (*sheep-cell agglutination test*), conhecido atualmente como teste capaz de identificar o FR (ROSE et al., 1948). A partir daí foi possível iniciar os estudos sobre os distúrbios imunológicos nos pacientes com a doença e diferenciar os tipos de artrite (HARRIS, 1990).

O diagnóstico precoce é difícil, uma vez que os sintomas iniciais, por não serem específicos, como indisposição, fadiga, fraqueza muscular, febre baixa e perda de peso,

podem facilmente ser confundidos com sintomas de outras doenças, de forma que o médico não cogita a possibilidade de ser AR (CHAN et al., 1994).

Os primeiros critérios para classificação da AR foram publicados em 1958 e utilizados por quase 30 anos (MITCHELL & FRIES, 1982), sofrendo revisão em 1987 (ARNETT et al., 1988). É importante salientar que esses critérios iniciais foram designados principalmente para classificação da doença e propósitos epidemiológicos, e não para diagnóstico de casos individuais, o que mostra que à época o diagnóstico era feito a partir de evidências clínicas nos pacientes (HARRIS, 1990). Os critérios de 1987 proporcionaram as bases para a definição da doença como conhecemos atualmente, mas foram criticados principalmente pela incapacidade de distinguir a AR de outras doenças reumatológicas em seu estágio inicial.

Em sua revisão mais recente, de 2010, a AR passou a ser diagnosticada clinicamente e classificada de acordo com os critérios estabelecidos pelo American College of Rheumatology (ACR) e pela European League Against Rheumatism (EULAR) (ALETAHA et al., 2010; NEOGI et al., 2010).

Estes critérios classificam um paciente como portador de AR com base na presença de sinovite em pelo menos uma articulação, sinovite esta que não pode ser explicada por outra condição, e uma pontuação de pelo menos 6 em um total de 10 em testes individuais.

A principal mudança é a redefinição do paradigma atual da doença, focando em características relacionadas a estágios iniciais da doença que estão associados com danos persistentes e/ou erosivos, e não mais em características dos estágios avançados. O objetivo é a instauração de uma terapia o quanto antes para minimizar os danos e desacelerar a progressão da doença e ocorrência de sequelas indesejáveis, uma vez que a intervenção medicamentosa precoce mostrou resultados promissores na redução dos danos articulares (VAN DER HEIDE et al., 1996; VAN DONGEN et al., 2007).

Uma grande vantagem da detecção precoce é a possibilidade de realização de testes clínicos para fármacos úteis no tratamento inicial da doença. Até o momento a incapacidade de diagnóstico precoce torna difícil identificar pacientes para a realização destes estudos clínicos tornando impossível a investigação da eficácia de fármacos para essa fase da doença (ALETAHA et al., 2010).

Especificamente, os critérios de classificação atuais definem diversos pontos, como a população a ser testada e a pontuação que cada um dos critérios tem:

População alvo, que deve possuir: a) pelo menos 1 articulação com sinovite (turgidez) e; b) caso em que a sinovite não pode ser explicada por outra doença

Sistema de pontuação

A) Envolvimento das articulações	
1 articulação grande	0 pontos
2-10 articulações grandes	1 ponto
1-3 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes)	2 pontos
4-10 articulações pequenas (com ou sem envolvimento de articulações grandes)	3 pontos
>10 articulações pequenas (pelo menos 1 articulação pequena)	5 pontos
B) Sorologia (pelo menos um resultado é necessário para a classificação)	
FR negativo e ACPA negativo	0 pontos
FR baixo-positivo ou ACPA baixo-positivo	2 pontos
FR alto-positivo ou ACPA alto positivo	3 pontos
C) Reagentes de fase aguda (pelo menos um resultado é necessário para a classificação)	
CRP normal e ESR normal	0 pontos
CRP anormal ou ESR anormal	1 ponto
D) Duração dos sintomas	
<6 semanas	0 pontos
≥6 semanas	1 ponto

Os pacientes com um total de 6 pontos ou mais são considerados como possuidores de AR. As definições dos critérios acima incluem:

- **Articulação envolvida**: refere-se à qualquer articulação com inchaço indicativo de sinovite.
- **Articulação pequena**: refere-se às articulações metacarpofalangeanas, interfalangeanas proximais, segunda à quinta metatarsfalangeanas e interfalangeanas do polegar e do pulso.
- **Articulação grande**: refere-se às articulações dos ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos.
- **Determinação da categoria de padrão de articulação**: Os pacientes devem ser categorizados de acordo com o número de articulações envolvidas e designados na categoria com a maior pontuação. Um paciente com sinovite em 2 articulações grandes e 2 articulações pequenas será categorizado em “1-3 articulações pequenas” por apresentar maior pontuação.
- **Categorias sorológicas**: As definições são baseadas no limite superior de normal (LSN): *negativo* = abaixo ou igual ao LSN; *baixo-positivo* = maior que LSN mas ≤ 3 vezes LSN; *alto-positivo* = > 3 vezes LSN.
- **Duração dos sintomas**: refere-se à percepção pelo paciente da duração máxima dos sinais ou sintomas de sinovite de qualquer articulação envolvida clinicamente quando do exame.

Entretanto, estes novos critérios são totalmente baseados no conhecimento atual, podendo ser atualizados à medida que biomarcadores genéticos, sorológicos, protéicos ou de imagem proporcionem uma base melhor para a classificação da doença.

1.5 Tratamento

As contribuições das pesquisas para o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na gênese da AR mudaram a forma como a doença é vista pelos médicos. Ocorreu uma mudança de paradigma, em que a terapia que era voltada para o controle dos sintomas, por meio de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e corticosteróides, deu lugar a uma abordagem voltada ao combate dos processos imunológicos, por meio de fármacos anti-reumáticos modificadores da doença (DMARDs) e agentes biológicos (COLMEGNA et al., 2012).

Uma vez diagnosticada a AR, o tratamento ideal seria aquele capaz de restaurar a tolerância imunológica, reprogramando o sistema imune do paciente para que não ocorra um auto-reconhecimento das proteínas e antígenos. No entanto, uma vez que esses processos

ainda não estão totalmente elucidados, esse objetivo fica distante de ser alcançado. Assim, os tratamentos atuais visam a supressão da inflamação e o controle das complicações, como risco cardiovascular, osteoporose e câncer (KLARESKOG et al., 2009).

Um fator complicador do tratamento da AR é a presença de inúmeras vias biológicas relacionadas com a doença, vias estas algumas vezes complementares. Tais vias variam não só de paciente para paciente, mas também mudam com o decorrer do tempo em um mesmo paciente. Esse fato requer que as terapias sejam acompanhadas e modificadas à medida que comecem a falhar.

Na ausência de biomarcadores adequados, que possam direcionar a escolha mais adequada dos medicamentos disponíveis, a estratégia inicial atual é uma terapia agressiva de uma combinação de dois ou mais DMARDs, em que um é o metotrexato (MTX) (1), em suas doses máximas toleradas, por via oral ou subcutânea.

1.5.1 DMARDs

Os DMARDs compõem uma categoria de fármacos não-relacionados estruturalmente que são úteis na diminuição da velocidade da destruição da cartilagem e ossos na AR. Podem ser subdivididos em fármacos de baixa massa molecular e biofármacos.

Os DMARDs mais comumente prescritos são MTX (1), hidroxicloroquina (HCQ) (2), leflunomida (3) e sulfasalazina (SSZ) (4). Outros DMARDs em uso clínico incluem sais de ouro, azatioprina (5), ciclosporina A, ciclofosfamida (6) e cloroquina (7) (GOEKOOP-RUITERMAN et al., 2005).

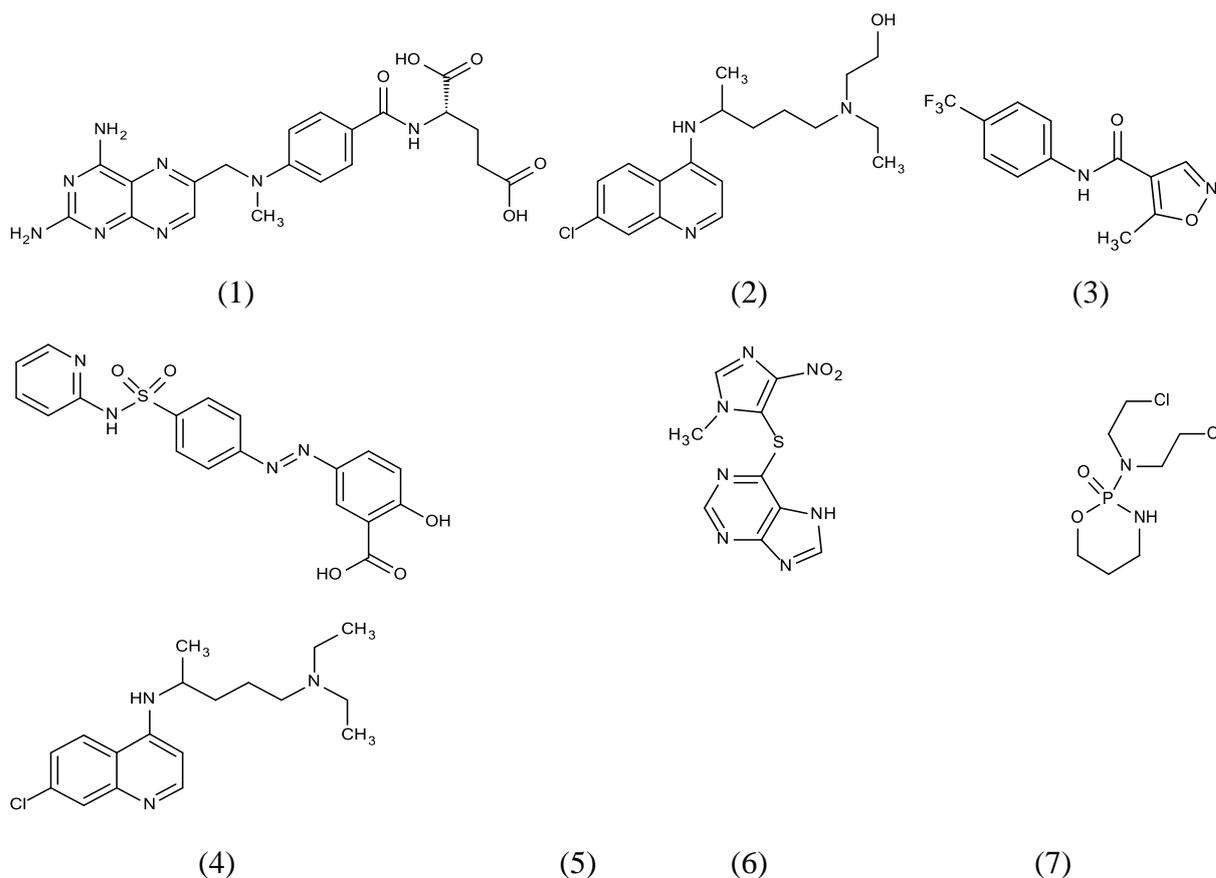


Figura 3 – Estrutura dos DMARDs comumente prescritos na diminuição da velocidade da destruição da cartilagem e ossos na AR.

MTX (1) é o fármaco mais utilizado no tratamento da AR no mundo todo. Ele é administrado por via oral, intramuscular ou subcutânea, em doses que variam de 7,5 a 25 mg uma vez por semana. MTX (1) possui uma taxa de ligação à albumina de 42-57% e uma elevada distribuição nos tecidos. 10% do MTX (1) é convertido a 7-OH-MTX no fígado e ambos os compostos são excretados primariamente pelos rins, sendo que após uso prolongado de MTX (1) a depuração renal de MTX (1) e depuração de creatinina diminuem, por um mecanismo mediado por um efeito dependente de adenosina no parênquima renal. De 1 a 30% é excretado pela bile, e o MTX (1) possui uma extensa circulação entero-hepática. Sua meia-vida é de 6-8h e é ativamente captado por eritoblastos, eritrócitos, leucócitos, hepatócitos e sinoviócitos, e uma vez dentro da célula, sofre poliglutamação, o que impede sua difusão para o meio extracelular. Esse fato é o que permite que sua administração ocorra uma vez por semana (ALBRECHT & MUELLER-LADNER, 2010; CRONSTEIN, 2005).

O mecanismo de ação do MTX (1) é complexo e existem diversas hipóteses para explicar os efeitos observados, as quais incluem: (i) inibição da proliferação das células

sinoviais inflamatórias por meio da inibição da síntese de purinas e pirimidinas (por meio da inibição competitiva da enzima diidrofolato redutase); (ii) inibição da síntese de poliaminas (espermina e espermidina), que são metabolizadas por monócitos para formar NH_3 e H_2O_2 ; (iii) mudanças no estado redox celular e redução dos níveis intracelulares de glutathione, levando a diminuição do recrutamento de macrófagos e linfócitos e consequente redução da apoptose; (iv) inibição da enzima aminoimidazol carboxamida ribonucleotídeo (AICAR) transformilase, causando aumento nos níveis de AICAR e consequente inibição da adenosina monofosfato (AMP) deaminase, que culmina em um aumento nos níveis extracelulares de adenosina (CRONSTEIN, 2005; WESSELS et al.; 2008).

1.5.2 – Biofármacos

Assim que ficou estabelecido que citocinas, como IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-23, TNF- α , estão envolvidas em cada uma das fases da patogênese da AR, formas de antagonizar seus efeitos se tornaram uma das prioridades nas pesquisas (McINNES & SCHETT, 2007).

As ações pleiotrópicas das citocinas inflamatórias e suas implicações na AR respondem pelo sucesso clínico da abordagem de anular citocinas específicas, seus receptores, suas vias intracelulares de sinalização ou a fonte celular dessas citocinas. Por outro lado, a complexidade das interações célula-citocina, a redundância desses sistemas e o fato de que o perfil das citocinas muda com o decorrer da doença explicam a falta de uma uniformidade na resposta clínica (COLMEGNA et al., 2012).

Os agentes biológicos, *i.e.* biofármacos, que atuam em citocinas e células imunes que possuem um papel relevante para a AR, permitiram a manipulação de vias específicas, impedindo assim uma supressão imune generalizada.

Eles são divididos em 3 grupos a partir do seu alvo principal: (i) moduladores da atividade de citocinas; (ii) inibidores da ativação celular; e (iii) pequenas moléculas que atuam em vias de sinalização intracelular específicas.

1.5.2.1 Moduladores da atividade de citocinas

No final da década de 80, estudos com técnicas de biologia molecular mostraram que a citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é o principal regulador da imunopatogênese da AR, e a remoção de seu excesso dos sítios inflamatórios passou a ser um objetivo terapêutico (FELDMANN & MAINI, 2003).

O TNF- α é produzido primariamente por macrófagos e monócitos e também por células T, células B, sinoviócitos e fibroblastos. Em pacientes nos estágios iniciais e mais avançados, ele é superexpresso no sangue periférico e fluido sinovial. O racional por trás da inibição da atividade do TNF- α é baseado em seu efeito pleiotrópico. Ele é um gatilho inicial e um mediador central das citocinas inflamatórias, com os seguintes efeitos: (i) produz ativação de células T; (ii) induz a produção de moléculas de adesão (aumentando a infiltração de células T) e fatores de crescimento vascular (promovendo angiogênese); (iii) estimula a liberação de proteinases de fibroblastos, osteoclastos e condrócitos; (iv) induz a proliferação e maturação de osteoclastos (CHOY & PANAYI, 2001; TAYLOR, 2010).

Os efeitos dos agentes anti-TNF- α incluem a inibição de respostas de fase aguda, inibição do trânsito de leucócitos e diminuição da expressão de marcadores de destruição de ossos e cartilagens.

Atualmente existem 5 biofármacos anti-TNF- α disponíveis para o tratamento da AR: infliximabe, etanercepte, golimumabe, adalimumabe e certolizumabe pegol, e a neutralização da forma solúvel do TNF- α (sTNF) é o principal mecanismo de ação farmacológica destes medicamentos. Eles também atuam como antagonistas do TNF- α transmembranar (tmTNF- α) através do bloqueio de sua interação com os receptores TNFR1/2, os quais estão presentes em células responsivas.

Os anti-TNF- α se enquadram em 3 categorias: anticorpos IgG anti-TNF- α (infliximabe, golimumabe e adalimumabe), fragmentos Fab' PEG-lados (certolizumabe), e receptores TNFR2 modificados (etanercepte).

Infliximabe é uma proteína quimérica com ~25% de sequência de aminoácidos derivada de ratos e ~75% de sequência de aminoácidos derivada de humanos. Sua administração contínua gera anticorpos humanos anti-quiméricos, diminuindo o efeito do biofármaco e reações imunogênicas. Adalimumabe e golimumabe são anticorpos IgG totalmente humanos (SMOLEN & EMERY, 2011).

Etanercepte é uma proteína de fusão modificada geneticamente compreendendo as porções extracelulares do TNFR2 ligadas à porção Fc de IgG1 humanos, capaz de bloquear a ação de TNF- α por competir com os receptores membranares pelo TNF- α circulante.

Adalimumabe, golimumabe e etanercepte possuem domínios Fc capazes de fixar o complemento e se ligar a receptores Fc, induzindo assim citotoxicidade dependente de complemento e citotoxicidade dependente de anticorpos e mediada por células em linfócitos que expressam tmTNF- α (COLMEGNA et al., 2012).

Certolizumabe pegol é uma proteína PEG-lada humanizada contendo sequências de aminoácidos nas regiões determinantes de complementariedade, é derivada de um anticorpo murino anti-TNF- α . Ela não possui o receptor Fc e portanto não é capaz de ativar o complemento.

Embora o uso destes inibidores de TNF- α tenham revolucionado o tratamento da AR, ~30% dos pacientes não são responsivos à terapia com esses agentes, e a alternativa passa a ser a mudança para um fármaco com um mecanismo de ação distinto.

Interleucina 6 (IL-6) é a citocina mais abundante da sinóvia e seu papel na patogênese da AR foi demonstrado em modelos animais onde a inibição do receptor de IL-6 impediu a progressão da artrite (OHSHIMA et al., 1998).

Na AR, sua sinalização promove a diferenciação de células T em Th17, suprimindo a diferenciação de células T regulatórias, e estimula as células B, induzindo a produção de moduladores da fase aguda em hepatócitos e induzindo a anemia da fase crônica (COLMEGNA et al., 2012).

Tocilizumabe, um anticorpo monoclonal humanizado combinando a região determinante de complementariedade de um anticorpo murino antihumano-IL-6R-humana com um anticorpo IgG1 humano foi aprovado pelo FDA em 2010. Ele inibe competitivamente a sinalização modulada pelo receptor de IL-6 (FUJIMOTO et al., 2008).

IL-1 é uma citocina inflamatória que estimula respostas locais e sistêmicas. IL-1 β interage com receptores hipotalâmicos, culminando na produção de prostaglandinas, ciclooxigenase e febre. IL-1 β se liga a receptores de IL-1 e promove a síntese de IL-6. Exibe ainda efeitos diretos e indiretos na maturação de osteoclastos, contribuindo para a erosão óssea (COLMEGNA et al., 2012).

O único antagonista de IL-1 aprovado pelo FDA é o biofármaco anakinra, indicado no tratamento de AR não-responsiva a DMARDs, e que possui utilidade limitada no tratamento da AR quando comparado aos demais agentes biológicos disponíveis (COLMEGNA et al., 2012).

1.5.2.2 Inibidores de ativação celular

As células T ativadas são importantes efetores na patogênese da AR. Para que estejam completamente ativadas, essas células necessitam de 2 sinais de células apresentadoras de antígenos (APCs). O primeiro sinal é antígeno-específico e resulta do encontro do receptor das células T com complexo principal de histocompatibilidade (MHC) contendo o peptídeo

imunogênico nas APCs. O segundo sinal resulta da ligação de um receptor co-estimulatório na célula T a um ligante na APC. A interação de CD28 nas células T com CD80 ou CD86 nas APC é um exemplo de sinal co-estimulatório. Uma vez ativado, o antígeno 4 associado ao linfócito T-citotóxico (CTLA4) começa a ser expresso na superfície das células T. CD80 e CD86 possuem uma afinidade maior para CTLA4 quando comparado com CD28 (WEYAND & GORONZY, 2006).

Abatacepte é um biofármaco que é dirigido à modulação das células T pela via co-estimulatória CD80/CD86:CD28. Ele é uma proteína de fusão totalmente humana compreendendo a porção extracelular do CTLA4 e o fragmento Fc de uma IgG1 humana (KREMER et al., 2003). Essa molécula se liga com alta afinidade ao CD80/86 das APCs, impedindo que eles se liguem ao CD28 nas células T, interrompendo assim as respostas das células T que dependem do co-estímulo com CD28. Assim, o Abatacepte diminui a proliferação das células T, inibe a produção das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF- α e reduz a resposta imune humoral. Como o CTLA4 é capaz de se ligar diretamente às células precursoras de osteoclastos e inibir sua diferenciação, Abatacepte possui um efeito benéfico na erosão óssea (WEYAND & GORONZY, 2006).

Embora a AR seja vista classicamente como uma doença dependente de células T, o sucesso terapêutico obtido com o esgotamento de células B renovou o interesse das pesquisas sobre o papel dessas células na patogênese da AR.

Rituximabe é um anticorpo quimérico que esgota especificamente células B CD20. Sua indicação é primariamente para pacientes de AR que apresentam resposta inadequada e/ou intolerância a uma terapia anti-TNF- α ou DMARD (ENGEL et al., 2011). A principal atividade de esgotamento de células B atribuídas ao rituximabe envolve citotoxicidade dependente de anticorpos. Além disso, ao esgotar as células B, ocorre redução de interleucina 17A (IL-17A), interleucina 21 (IL-21) e interleucina 22 (IL-22) e consequente inibição da resposta de Th17 (COLMEGNA et al., 2012).

1.5.2.3 Pequenas moléculas que atuam em vias de sinalização intracelular específicas

Entende-se por “pequenas moléculas” compostos químicos com peso molecular menor que 1kDa. Neste caso, as micromoléculas deverão atuar em vias intracelulares que regulam a sobrevivência e proliferação celular, bem como síntese de citocinas e metaloproteases (SMOLEN & EMERY, 2011).

As vantagens dessas pequenas moléculas sobre os demais agentes biológicos incluem a biodisponibilidade por via oral e os custos de fabricação reduzidos. A maioria dessas moléculas bloqueiam proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs), tirosina cinase do baço (Syks) e janus cinases (JAKs) (COLMEGNA et al., 2012).

Até o presente momento, os inibidores com resultados mais promissores são o fostamatinibe sódico (8), um inibidor de Syk cinase de baço, e tofacitinib (9), um inibidor de JAK (BONILLA-HERNÁN et al., 2011).

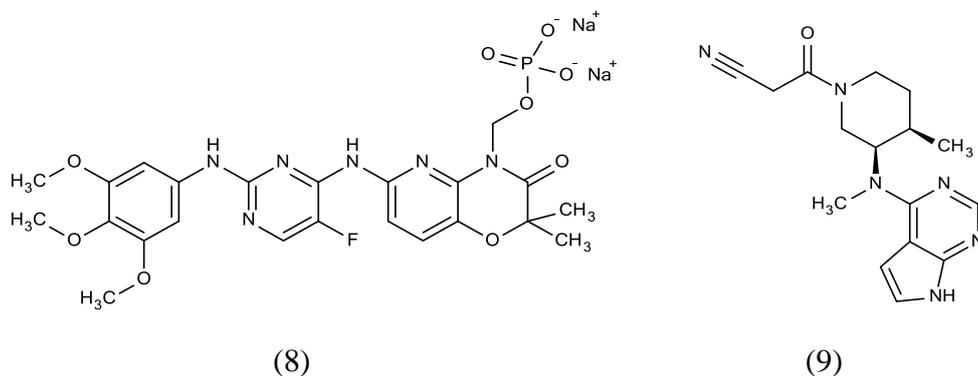


Figura 4 - Estruturas de fostamatinibe sódico (8) e tofacitinibe (9).

1.6 A escolha da via da adenosina para estudo na AR

As pesquisas sobre a AR visam entender o que causa a perda da tolerância e a inflamação localizada na articulação; encontrar caminhos para resolver as questões imunológicas e restaurar a homeostase e as articulações danificadas; desenvolver abordagens terapêuticas curativas e preventivas para que a AR deixe de ser considerada como uma doença crônica.

As terapias disponíveis, tanto convencionais quanto biológicas falham ou produzem efeitos terapêuticos apenas parciais. Além disso, há a falta de biomarcadores confiáveis para prognóstico, resposta terapêutica e toxicidade. Soma-se a isso a alta taxa de mortalidade dos pacientes com AR, devido a complicações sistêmicas, em especial as complicações cardiovasculares.

Embora o MTX (1) seja o fármaco de escolha no tratamento da AR, seu uso prolongado pode levar a complicações hepáticas e pulmonares, como a pneumonite (GOODMAN, T. A., POLISSON R. P., 1994). Nesse contexto, novas vias de sinalização vêm sendo buscadas para proporcionar novas alternativas terapêuticas.

Diversos são os motivos para escolher a via da adenosina, um conhecido agente anti-inflamatório endógeno (CRONSTEIN, 1994), para estudo e desenvolvimento de novas abordagens no contexto da AR:

- a) Adenosina pode suprimir a geração de íons superóxido em neutrófilos pela interação com receptores de superfície (CRONSTEIN et al., 1983);
- b) Adenosina inibe a adesão de neutrófilos no local da inflamação através da regulação de moléculas de adesão (FIRESTEIN et al., 1995);
- c) Adenosina regula a produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de óxido nítrico sintase em macrófagos, que são células que contribuem bastante para o dano tecidual na sinóvia (HASKÓ et al., 1996);
- d) Células dendríticas que se maturaram na presença de adenosina possuem uma capacidade reduzida de promover a diferenciação de linfócitos Th0 CD4+ em um fenótipo Th1, limitando a resposta pró-inflamatória iniciada pelas células T (PANTHER et al., 2003);
- e) Diversos fármacos atuam na via da adenosina: MTX (**1**) inibe indiretamente a via de síntese *de novo* de purinas, provocando acúmulo de vários intermediários que culmina na liberação de adenosina (CHAN & CRONSTEIN, 2002); MTX (**1**) inibe a enzima AICAR transformilase, causando aumento nos níveis de AICAR e consequente inibição da AMP deaminase, que culmina em um aumento nos níveis extracelulares de adenosina (CRONSTEIN, 2005; WESSELS et al.; 2008); e o ácido acetil salicílico (**10**), salicilato de sódio (**11**) e SSZ (**4**) são capazes de aumentar a concentração de adenosina em exudatos inflamatórios (CRONSTEIN et al., 1999);
- f) Indivíduos que são incapazes de produzir a enzima adenosina deaminase (ADA; EC 3.5.4.4), enzima que metaboliza adenosina e 2-desoxiadenosina, são portadores de uma condição conhecida como imunodeficiência combinada grave, gerando acúmulo de 2-desoxiadenosina trifosfato (dATP), que inibe a atividade da ribonucleotideo redutase, impedindo a proliferação de linfócitos e comprometendo o sistema imune (CHAN et al., 2007).

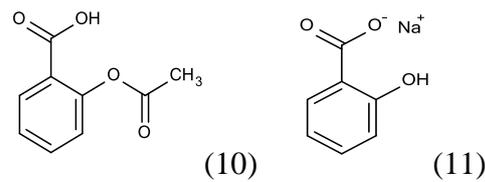


Figura 5 - Estruturas do ácido acetil salicílico (10) e salicilato de sódio (11).

Desta forma, há interesse em que a concentração de adenosina esteja aumentada no local da inflamação (articulações) para que esses efeitos anti-inflamatórios da adenosina sejam capazes de proporcionar uma melhora no quadro clínico do paciente com AR.

Para alcançar essa finalidade, pode-se procurar por moléculas que sejam capazes de atuar nos receptores de adenosina como agonistas ou moléculas que sejam capazes de impedir sua metabolização, resultando no aumento da concentração de adenosina no fluido sinovial.

Dentre essas duas opções, a escolhida para este estudo é o bloqueio da metabolização da adenosina pela inibição da ADA pelas seguintes razões:

a) A concentração de ADA no líquido sinovial é maior que a concentração de ADA no soro de pacientes com AR (ZAKERI et al., 2012);

b) possui inibidor aprovado para uso clínico, mas para outra finalidade:

Pentostatina (Nipent®) – indicado para pacientes com tricoleucemia não tratada ou não responsivos a interferon- α ;

Isso mostra que a inibição da ADA é uma abordagem clínica viável e que no contexto da AR essa inibição seria mais pronunciada no local desejado, ou seja nas articulações.

1.7 Adenosina Deaminase

ADA é uma enzima importante no metabolismo purínico por catalisar a desaminação de adenosina e 2'-desoxiadenosina à inosina e 2'-desoxiinosina, respectivamente, e amônia (CONWAY & COOKE, 1939; BRADY, 1942).

São conhecidas 2 isoenzimas distintas, chamadas de ADA 1 e ADA2 (ZAVIALOV et al., 2010). ADA1 e ADA2 humanas possuem propriedades catalíticas, bioquímicas e imunoquímicas distintas: ADA1 possui uma afinidade 100 vezes maior pela adenosina (quando comparada à ADA2), é altamente inibida por EHNA e atinge sua atividade máxima em pH fisiológico (RATECH et al., 1981; ZAVIALOV & ENGSTRÖM, 2005; AGARWAL et al., 1977; MURAOKA et al., 1990). ADA2 é um homodímero simétrico (enquanto ADA1 é monomérica) e possui arranjos diferentes em seus sítios catalíticos, explicando assim as diferenças de afinidade pelos substratos e inibidores.

ADA1 é expressa em todos os tecidos e também nos eritrócitos e concentrações elevadas são encontradas no sistema linfóide (VAN DER WEYDEN & KELLEY, 1976; CHECHIK et al., 1981). A sequência de aminoácidos da ADA1 humana possui uma homologia de 91% com a ADA1 bovina (DADDONA et al., 1984; KELLY et al., 1996). ADA1 é capaz de reduzir os níveis intracelulares de adenosina e 2'-desoxiadenosina. Um excesso de 2'-desoxiadenosina gera a produção de 2'-desoxiadenosina-trifosfato (dATP) que, em níveis elevados, ativa vias apoptóticas (NIITSU et al., 1998; ALDRICH et al., 2000).

ADA1 desempenha ainda um papel importante no desenvolvimento do sistema imune, função e regulação de células imunes (BLACKBURN & KELLEMS, 2005; FRANCO et al., 2007; ANTONIOLI et al., 2012). Seu papel metabólico de regulação dos níveis de adenosina é desempenhado intra- e extracelularmente (AKKARI et al., 2006).

ADA2 sofre extensa glicosilação e apresenta uma ponte dissulfeto conservada e um peptídeo sinalizador em sua estrutura, sugerindo que ADA2, diferentemente de ADA1, atua especificamente no ambiente extracelular (ZAVIALOV et al., 2010).

Apesar da atividade ADA2 no plasma humano ser conhecida há tempo (RATECH et al., 1981), a proteína responsável pela sua atividade foi isolada recentemente (ZAVIALOV & ENGSTRÖM, 2005) e, embora responda por uma pequena parcela da atividade total de ADA, ela é a enzima predominantemente circulante no soro de indivíduos normais (RATECH & HIRSCHHORN, 1981; IWAKI-EGAWA et al., 2006), sendo liberada por monócitos/macrófagos. ADA2 pertence à nova família de fatores de crescimento de ADA (ADGFs), que possuem um papel importante no desenvolvimento de tecidos (ZAVIALOV & ENGSTRÖM, 2005).

Doravante, sempre que for utilizado o acrônimo ADA, entende-se que estejamos nos referindo a ADA1.

1.7.1 Características estruturais da ADA

Os estudos de cristalografia com ADA bovina e murina mostraram que a enzima possui uma estrutura de barril (β/α)₈, com um sítio ativo profundo e um átomo de Zn²⁺ localizado na porção carboxi-terminal do barril- β , o qual é essencial para a catálise e estabilidade da proteína (WILSON et al., 1991; NIU et al., 2010).

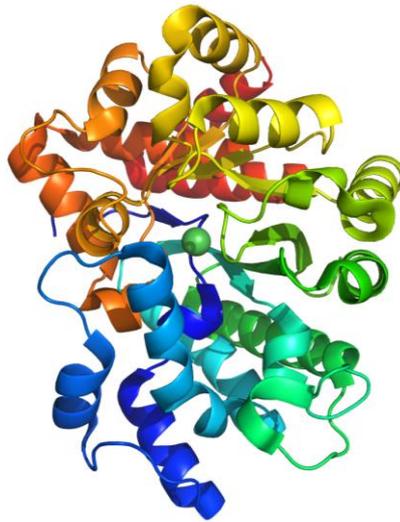


Figura 6 - Estrutura cristalográfica da ADA humana (COD PDB: 3IAR), evidenciando a estrutura de barril (β/α)₈ e o átomo de Zn^{2+} .

Seu sítio ativo possui duas conformações principais: a conformação aberta é usualmente adotada na ausência de substrato, a forma fechada é observada em complexos com uma estrutura nucleosídica (WILSON et al., 1991; SHARFF et al., 1992). A forma fechada é formada de um subsítio hidrofóbico (F0), uma área hidrofílica (S0), delimitada por um portão formado pela cadeia principal dos aminoácidos da folha- β (Leu182-Asp185) e duas cadeias laterais de leucina (Leu 58 e Leu62) de uma α -hélice (Thr57-Ala73). Uma vez aberto, esse portão revela dois subsítios hidrofóbicos adicionais, F1 e F2 (TAKAYOSHI et al., 2005).

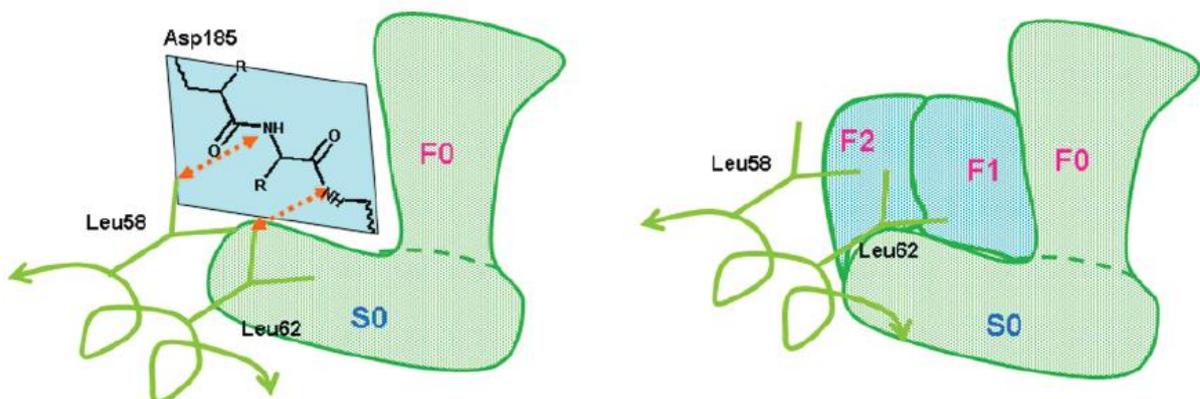


Figura 7 - Formas fechada (esquerda) e aberta (direita) do sítio ativo da ADA humana, e respectivos subsítios S0, F0, F1 e F2 (Adaptado de TAKAYOSHI et al., 2005).

1.7.2 Características catalíticas da ADA

ADA é uma enzima ideal para estudos mecanísticos por ser pequena, monomérica, facilmente purificada e por catalisar uma reação relativamente simples com extrema eficiência (CORTÉS et al., 2014). Por conta dessa simplicidade e eficiência, a ADA tem sido estudada

visando o entendimento da especificidade de seu substrato e estabilidade enzimática, parâmetros e mecanismos cinéticos (AGARWAL et al., 1975; NAIR & WIECHERT, 1980; SHU & FRIEDEN, 2005; SABOURY et al., 2002).

O mecanismo catalítico, ilustrado na Figura 8, pode ser descrito da seguinte forma: inicialmente o Zn^{+2} , um ácido de Lewis forte, ativa uma molécula de água, por meio do aumento de sua acidez, gerando assim uma hidroxila (nucleófilo). Concomitantemente, Asp296 e Gly184 estabelecem ligações de hidrogênio com N7 e N3 da adenosina, reduzindo assim a aromaticidade do anel purínico. Glu217 interage também com o NH_2 e N1 da adenosina, orientando a molécula. Isso torna o C6 da ligação dupla $C6=N1$ da adenosina mais suscetível ao ataque nucleofílico da hidroxila ligada ao Zn^{+2} , formando assim o intermediário tetraédrico em C6, no qual a hidroxila 6-OH interage com o Zn^{+2} e grupos polares de His238 e Asp295. His238 e Glu217 orientam a saída da molécula de NH_3 e formação da inosina (WU et al., 2010). A estereoespecificidade da reação é conferida pela localização do Zn^{+2} , His238 e Asp295 na face B do anel purínico (WILSON et al., 1991).

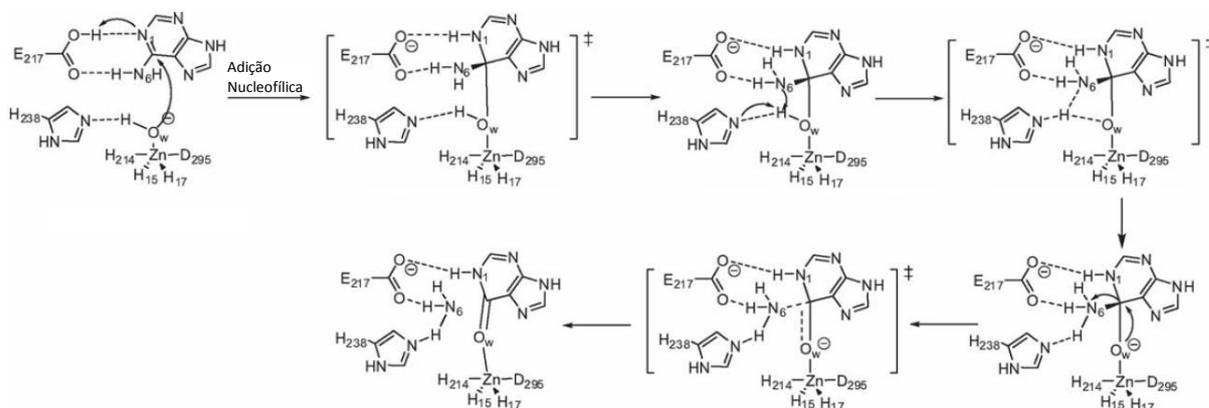


Figura 8 – Mecanismo catalítico proposto para a ADA humana (Adaptado de WU et al., 2010).

1.7.3 Inibidores da ADA

Atualmente os inibidores mais potentes da ADA são os produtos naturais cofornicina (**12**) (K_i 0,01 nM) e pentostatina (**13**) (K_i $2,5 \times 10^{-3}$ nM), que foram descritos mais de 30 anos atrás (AGARWAL et al., 1977). Atribui-se sua atividade à ligação praticamente irreversível desses compostos com a ADA, mimetizando o estado de transição tetraédrico do mecanismo catalítico (TERASAKA et al., 2003).

A busca de inibidores da ADA data de 1980, e a biblioteca de compostos compreende em torno de 400 moléculas. Apesar da vasta gama de compostos, os inibidores sintéticos e potentes da ADA são poucos, incluindo eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)-adenina (EHNA) (**14**),

com um K_i na faixa de nM e seu análogo pirazolo-pirimidínico (**15**) (K_i $5,3 \times 10^{-2}$ nM) (DA SETTIMO et al., 2005). Eles não se mostraram adequados para uso clínico por apresentarem alta toxicidade, baixa estabilidade química, farmacocinética insatisfatória e um metabolismo rápido (TERASAKA et al., 2004).

Acreditando que essas propriedades indesejadas são oriundas da estrutura bicíclica de (**12**), (**13**), (**14**) e (**15**), postulou-se que inibidores sem essa subunidade possuiriam propriedades melhoradas. De fato, o derivado 4-imidazolcarboxamida apresentou K_i de $5,9 \mu\text{M}$ (**16**), revelando ser uma estrutura promissora (TERASAKA et al., 2003), a qual foi otimizada por hibridização molecular com o composto (**17**) ao análogo (**18**), com K_i de 7,7 nM (TERASAKA et al., 2004).

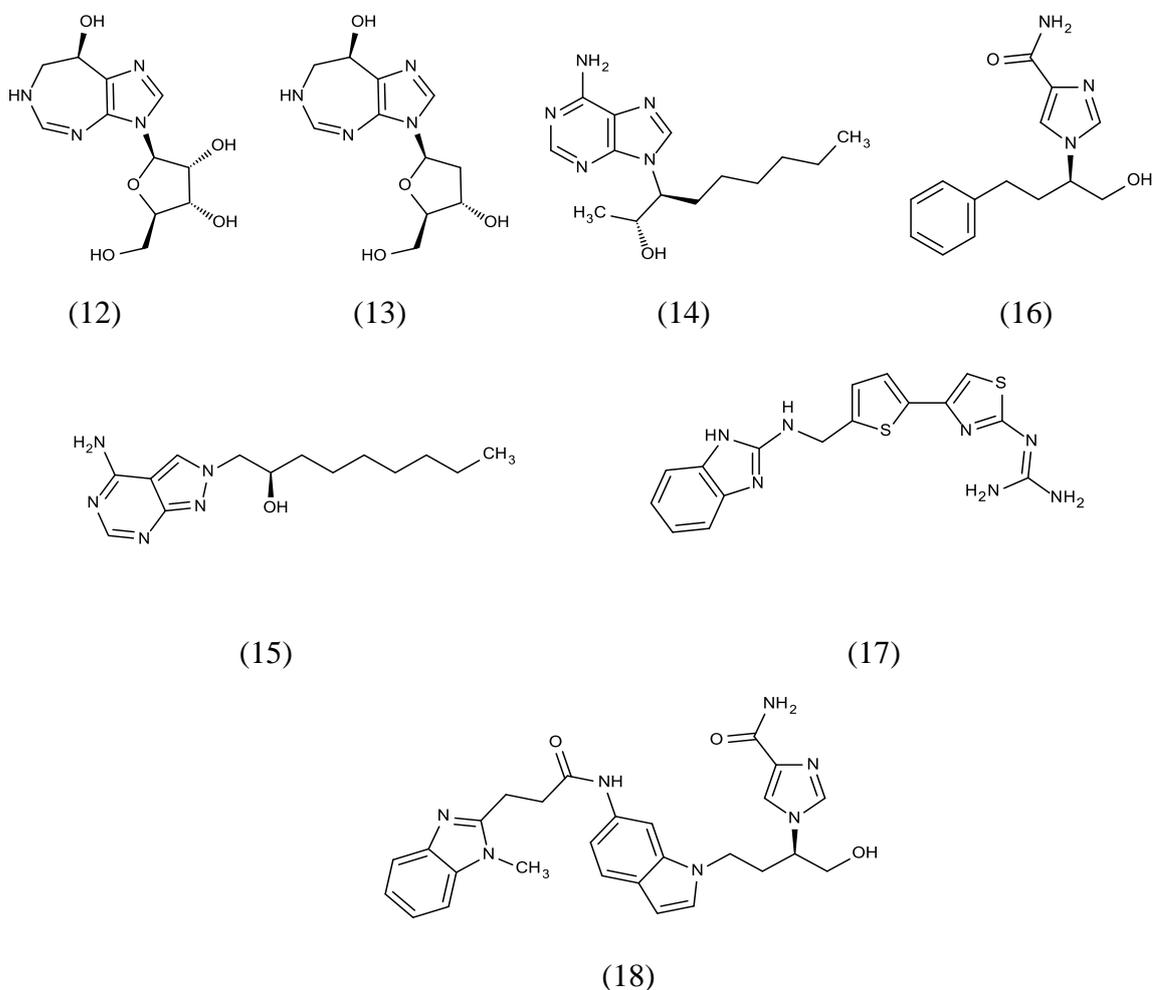


Figura 9 – Estrutura dos principais inibidores da ADA humana.

1.8 Modelagem Molecular

A modelagem molecular é uma disciplina que se utiliza de estratégias computacionais para modelar e/ou deduzir informações a partir de um sistema em seu nível atômico (PENSACK, 2009). Tais estratégias incluem cálculos de energia de determinado sistema, processos de minimização de energias e dinâmica molecular. A modelagem molecular é capaz também de identificar regiões moleculares envolvidas nas interações responsáveis por determinada atividade biológica.

A modelagem molecular tem sua origem quando os conhecimentos de mecânica clássica começam a ser aplicados na química para descrever os sistemas moleculares, gerando assim a mecânica molecular. As energias são calculadas a partir de campos de forças, os quais são funções matemáticas que modulam a variação de energia quando as mesmas se modificam de seus estados iniciais. A dinâmica molecular, outro método clássico, é uma simulação computacional do movimento de um número finito de átomos por um determinado período de tempo, obedecendo a equações Newtonianas de movimentos e as forças atuantes no sistema. É uma técnica útil no estudo de bicamadas lipídicas, enovelamento de proteínas e no modo de interação de ligantes e seus biorreceptores (SANT'ANNA, 2009).

O desenvolvimento da química quântica permitiu cálculos mais precisos, e ao mesmo tempo mais complexos, para os sistemas moleculares. Os principais métodos quânticos utilizados são os métodos *ab initio* e os métodos semi-empíricos. O método *ab initio* tem sua origem na necessidade de descrever eventos químicos onde correlações eletrônicas (interações entre elétrons na estrutura eletrônica de um sistema quântico) são importantes (FRIESNER, 2005).

Apesar de sua importância, os cálculos envolvidos no método *ab initio* são longos capazes de comprometer o tempo de trabalho. Dessa forma, foram desenvolvidos os métodos semi-empíricos, a partir de parâmetros empíricos, para permitir o cálculo de propriedades moleculares de forma mais rápida em sistemas moleculares mais complexos.

Toda essa pesquisa sobre o cálculo de propriedades moleculares permitiu o aparecimento de técnicas que possuem aplicações em pesquisa, como desenvolvimento de materiais, entendimento de reações químicas, e em especial no desenvolvimento de novos fármacos.

Estratégias como o desenho de fármacos baseado na proteína (do inglês *Structure Based Drug Design* – SBDD) incorporam o conhecimento da estrutura tridimensional da proteína para identificar relações entre a estrutura e a atividade, estudar as bases moleculares das interações ligante-proteína, caracterizar sítios de ligação, orientações e conformações

putativos de interação de ligantes ainda não co-cristalizados e a observação do comportamento dinâmico de moléculas e complexos de interesse farmacológico (CAVASOTTO & PHATAK, 2009; VERLI & BARREIRO, 2005).

O SBDD começa com a identificação de um sítio de ligação na proteína alvo. Preferencialmente obtém-se o cristal da proteína alvo em conjunto com o substrato ou algum ligante conhecido. A partir daí, diversas estratégias de modelagem molecular podem ser utilizadas para desenvolver um protótipo.

O conhecimento prévio de substratos e/ou cofatores, bem como inibidores, ainda que não ideais, servem de base para a identificação de interações que podem ser modificadas para maximizar as interações complementares com o sítio ativo (ANDERSON, 2003).

Uma vez identificadas essas interações e desenhados novos compostos, utilizam-se ferramentas de ancoramento molecular para triar conformações capazes de se ajustar ao sítio ativo e avaliar o sucesso de tal proposição. Esse processo auxilia na escolha dos compostos a serem sintetizados e faz parte de um processo iterativo, no qual os compostos que obtiveram sucesso são submetidos a novas etapas de otimização (HÖLTJE et al., 2008).

Exemplos de fármacos que foram desenvolvidos a partir dessa abordagem incluem captopril (**19**), zanamivir (**20**), oseltamivir (**21**), amprenavir (**22**) e nelfinavir (**23**).

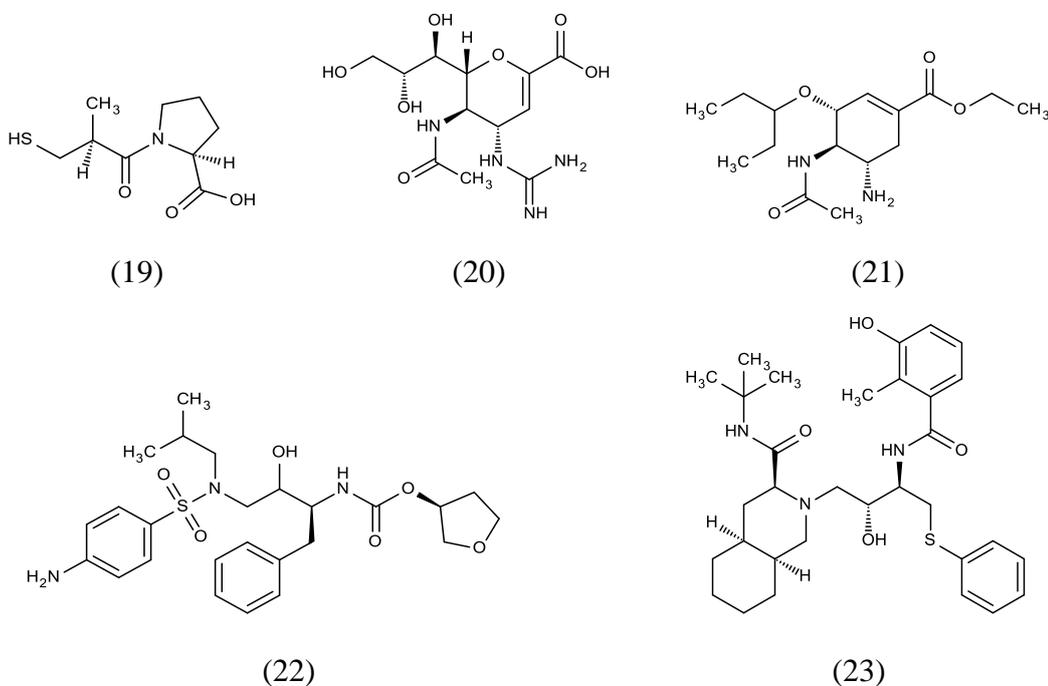


Figura 10 - Fármacos desenvolvidos a partir de SBDD.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivos a comparação dos perfis de reconhecimento molecular dos inibidores conhecidos da ADA, eleição dos grupos funcionais farmacofóricos para o perfil de inibição da ADA através de estudos de ancoramento molecular, por meio de:

- Análise dos inibidores conhecidos;
- Desenho dos ligantes, minimização e validação dos métodos computacionais;
- Identificação das principais interações com o sítio ativo.

Uma vez identificadas as principais interações com o sítio ativo, será feita a proposição de novos inibidores da ADA humana explorando as interações dos grupos funcionais farmacofóricos, a realização de estudos de ancoramento molecular destes novos compostos propostos na ADA humana avaliando seus respectivos perfis de reconhecimento molecular *in silico*, a aquisição e/ou síntese desses compostos propostos e teste em um protocolo de inibição competitiva da ADA humana por meio de ensaio espectrofotométrico.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenho e validação da metodologia de minimização dos ligantes

Os compostos avaliados nos estudos *in silico* foram desenhados no programa Spartan'08 (Wavefunction Inc.). Utilizou-se como parâmetro a estrutura da adenosina e comparou-se a média do comprimento das ligações dos métodos de minimização utilizados (6-31G*, AM1, PM3, MNDO e RM1) com o comprimento médio das ligações descritas para o cristal de adenosina (LAI & MARSH, 1972).

3.2 Validação da Metodologia de ancoramento molecular

Os estudos de ancoramento molecular foram realizados no programa GOLD 5.2 (do termo em inglês *Genetic Optimization for Ligand Docking*). As seguintes etapas foram seguidas para todas as funções de ranqueamento:

- Adição de átomos de H na ADA humana (código PDB: 3IAR);
- Definição do estado de protonação das histidinas e da geometria do metal:

His15 - N^δ protonado;

His17 - N^δ protonado;

His214 - N^δ protonado;

His238 - N^e protonado;

Geometria do metal - bipirâmide trigonal;

- Definição do sítio ativo: raio de 10Å do ligante 2'-desoxiadenosina;
- Obtenção e análise dos resultados.

Para a escolha da função de ranqueamento foi realizado o re-ancoramento com a molécula 2'-desoxiadenosina e medido o desvio médio quadrático (RMSD) da conformação gerada por cada uma das funções disponíveis no programa com a conformação cristalizada com a ADA. Foram realizadas 10 corridas para cada uma das funções disponíveis, a saber ASP, GOLDScore, CHEMscore e CHEMPLP, e anotado o valor de RMSD para a solução com maior pontuação em cada corrida. Em seguida foi obtida a média desses 10 valores de cada uma das funções e escolhida a função de ranqueamento que obteve o menor valor médio.

A função ASP é derivada da análise estatística de distribuições e frequências de interações de pares de átomos observadas experimentalmente, de uma coleção de complexos, gerando assim potenciais para estabelecer interações favoráveis ou não (MOOJI & VERDONK, 2005).

A função GOLDScore considera a soma dos termos de energia de ligação de hidrogênio do complexo proteína-ligante, energias de Van der Waals do complexo e do ligante, e energia torcional do ligante (JONES et al., 1997).

A função CHEMscore é derivada a partir de dados experimentais de 82 complexos proteína-ligante, estimando a mudança da energia livre total decorrente da interação (ELDRIDGE et al. 1997).

A função CHEMPLP contém um potencial específico (*Piecewise Linear Potential*) para o cálculo da complementariedade estérica entre átomos (diferentes de hidrogênio), da proteína e do ligante, além de termos para ligações de hidrogênio que consideram distâncias e ângulos destas ligações, bem como ligações envolvendo metais. Contém também termo para colisões entre átomos e um termo torcional derivado do campo de força *Tripos* (KORB et al, 2009).

3.3 Seleção de Compostos Semelhantes a partir de Banco de Dados e Análise das Interações

Os inibidores da ADA humana e bovina descritos foram selecionados do banco de dados ChEMBL^{2,3}. Em seguida, eles foram classificados quanto a sua estrutura a partir do critério abaixo:

² Disponível em: www.ebi.ac.uk/chembl/ - Acesso em: 10/11/2014.

Grupo 1A - Compostos com anel de 5 membros com substituinte estruturalmente distinto de um anel oxolânico;

Grupo 1B - Compostos com anel de 5 membros com substituinte estruturalmente semelhante a um anel oxolânico;

Grupo 2A - Compostos bicíclicos com anéis de 5 e 6 membros com substituinte estruturalmente distinto de um anel oxolânico;

Grupo 2B - Compostos bicíclicos com anéis de 5 e 6 membros com substituinte estruturalmente semelhante de um anel oxolânico;

Grupo 3A - Compostos bicíclicos com anéis de 5 e 7 membros fundidos com substituinte estruturalmente distinto de um anel oxolânico;

Grupo 3B - Compostos bicíclicos com anéis de 5 e 7 membros fundidos com substituinte estruturalmente semelhante de um anel oxolânico.

A Figura 11 mostra exemplos de estruturas pertencentes a cada um dos grupos.

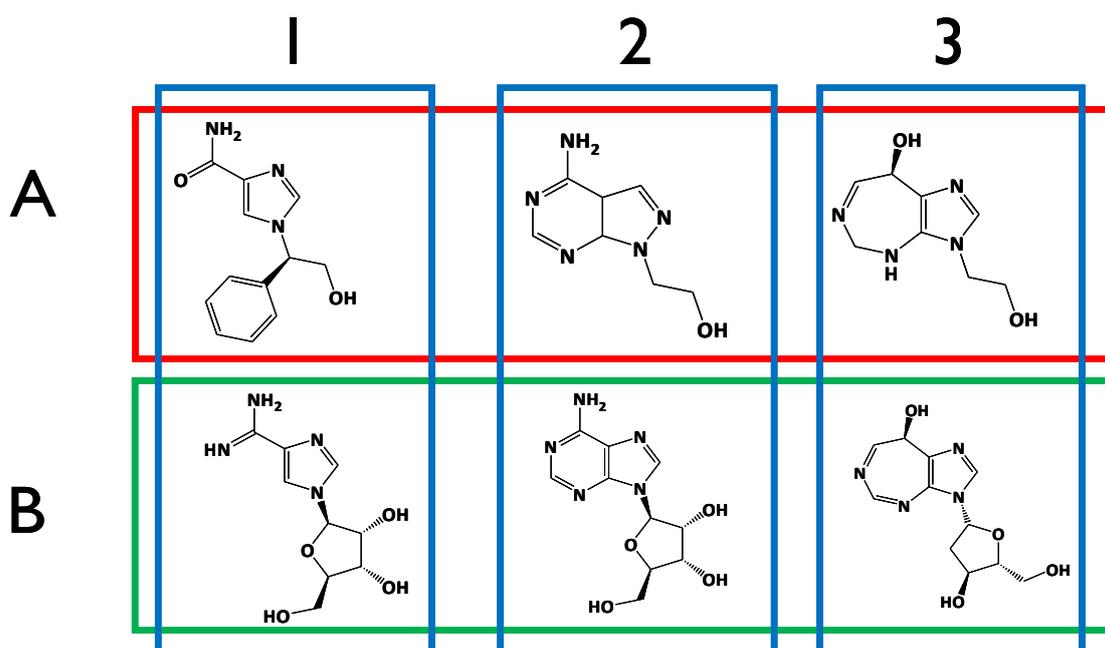


Figura 11 - Exemplos de estruturas pertencentes aos grupos 1A, 1B, 2A, 2B, 3A e 3B.

Em seguida, foi avaliada a presença ou ausência de semelhança estrutural de cada composto com os demais integrantes do mesmo grupo. A semelhança estrutural limita-se, nesse caso, a diferenças em um único átomo escolhido dentre C, N, O e halogênios. Nessas condições os critérios para presença de semelhança estrutural foram:

³ O autor não possui nenhum conflito de interesse com o banco de dados em questão.

a) Adição/remoção de substituinte:

A Figura 12 ilustra duas moléculas cuja diferença estrutural reside na presença de um grupo amina. Tal diferença é considerada dentro dos critérios propostos.

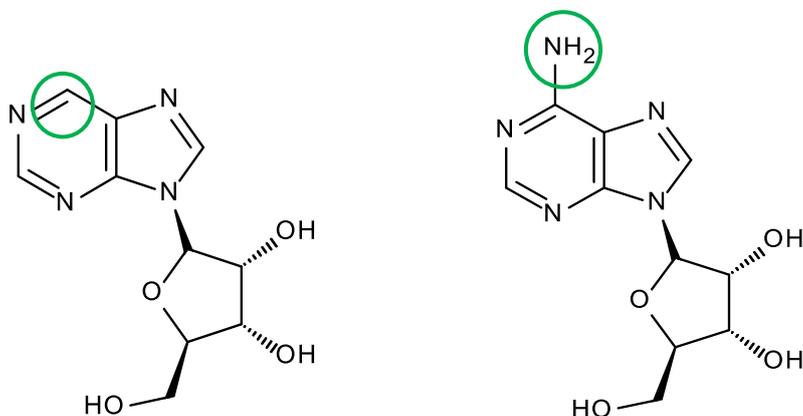


Figura 12 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério da adição/remoção de substituintes.

b) Troca de substituinte:

A Figura 13 ilustra duas moléculas cuja diferença estrutural reside na presença de um grupo hidroxila em uma e a presença de um grupo amina em outra. Tal diferença é considerada dentro dos critérios propostos.

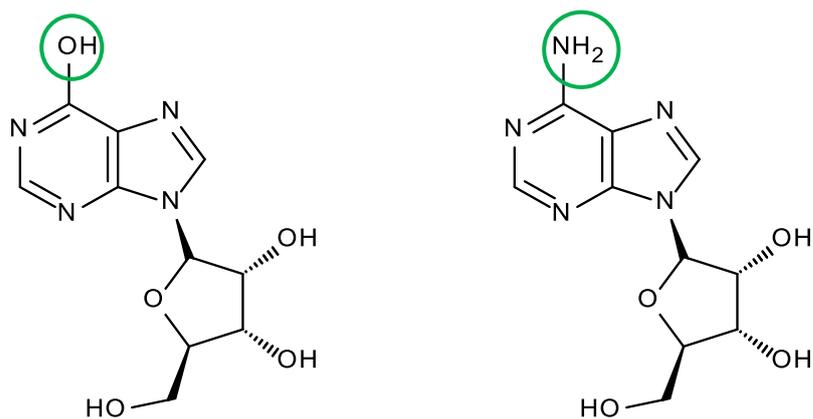


Figura 13 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério da troca de substituintes.

c) Isosterismo clássico:

A Figura 14 ilustra duas moléculas cuja diferença estrutural reside na substituição de um átomo de nitrogênio do anel purínico por um átomo de carbono. Tal diferença é considerada dentro dos critérios propostos.

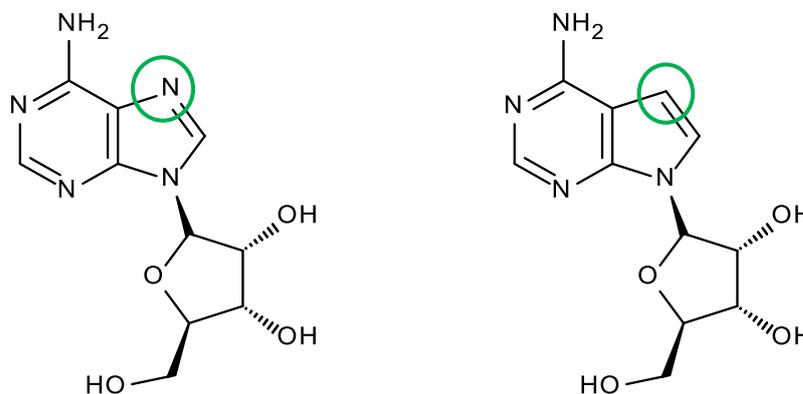


Figura 14 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério do isosterismo.

d) Inclusão de metileno em série homóloga:

A Figura 15 ilustra duas moléculas cuja diferença estrutural reside na inclusão de um metileno na cadeia alquílica. Tal diferença é considerada dentro dos critérios propostos.

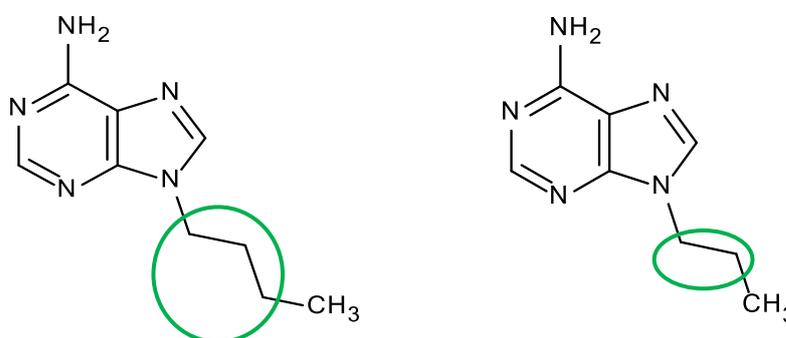


Figura 15 - Exemplo de compostos considerados semelhantes a partir do critério da adição de metileno em série homóloga.

Uma vez identificada a semelhança entre compostos, realizou-se a avaliação dos valores de pK_i conhecidos. Uma diferença de valores de pK_i maior que 2 foi considerada significativa e esses compostos foram posteriormente submetidos a estudos de ancoramento molecular para avaliação do modo de ligação dos compostos com a enzima.

Os estudos de ancoramento molecular foram novamente realizados no programa GOLD 5.0. Os mesmos critérios utilizados anteriormente foram aplicados para todas as combinações de compostos cuja diferença de valor de pK_i foi maior que 2.

3.4 Estudos de cinética enzimática

A cinética da ADA foi estudada por meio da obtenção dos parâmetros da enzima e por ensaios de inibição.

3.4.1 Obtenção dos parâmetros da ADA humana

A conversão da adenosina em inosina pela ADA foi ensaiada em um método de detecção espectrofotométrica contínua adaptado de Murphy e colaboradores (1982). Em uma cubeta de quartzo, com um caminho ótico de 1 cm, foram adicionados tampão fosfato (pH 7,4), água e adenosina, os quais foram misturados por inversão. Adicionou-se ADA com imediata mistura por inversão e posicionamento da cubeta no espectrofotômetro para monitoramento do decréscimo de absorvância em um comprimento de onda de 265 nm durante 5 minutos. Anotou-se os valores de absorvância no tempo 0 e no tempo de 5 minutos.

Foram ensaiadas as seguintes concentrações de adenosina: 5 μM , 10 μM , 25 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM , 75 μM , 80 μM , 100 μM e 150 μM . A velocidade da reação foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Unidades/mL de enzima} = \frac{(\Delta A_{265\text{nm}}/\text{min}) (3) (\text{fd})}{(8,1) (0,1)} \quad \text{Equação 1}$$

Sendo que:

$A_{265\text{nm}}$ = absorvância medida a 265nm

3 = volume total da cubeta em mL

fd = fator de diluição

8,1 = coeficiente de extinção milimolar da adenosina a 265nm

0,1 = volume de ADA usado em mL

3.4.2 Ensaios de inibição da ADA humana

Os ensaios de inibição para obtenção dos valores de K_i dos inibidores obedeceram ao mesmo procedimento acima. Em uma cubeta de quartzo, com um caminho ótico de 1 cm, foram adicionados tampão fosfato (pH 7,4), água, adenosina e inibidor, os quais foram misturados por inversão. Adicionou-se ADA humana com imediata mistura por inversão e posicionamento da cubeta no espectrofotômetro para monitoramento do decréscimo de absorvância em um comprimento de onda de 265 nm durante 5 minutos. Anotou-se os valores de absorvância no tempo 0 e no tempo de 5 minutos. A Figura 16 ilustra os inibidores

testados, EHNA (**14**), ácido 1-benzil-5-metil-1H-pirazol-3-carboxílico (**24**) e 1-benzil-5-metil-1H-pirazol-3-formamida (**25**).

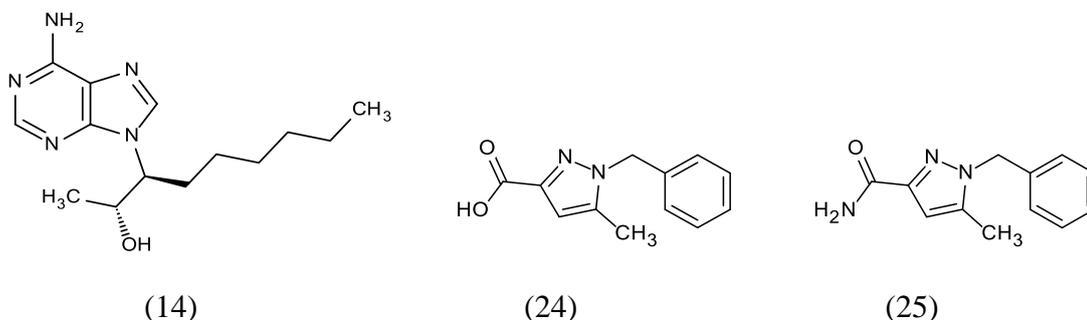


Figura 16 - Estrutura dos compostos testados como inibidores da ADA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Desenho e validação da metodologia de minimização dos ligantes

A validação dos métodos computacionais deve ser feita a partir da comparação com dados experimentais, para mostrar que os estudos *in silico* são capazes de reproduzir os resultados *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, deve-se escolher um parâmetro que permita essa comparação de forma eficaz. Alguns dos compostos em questão foram submetidos a ensaios de ancoramento molecular, que modificaram sua estrutura tridimensional, *i.e.* os ângulos de torção das ligações, mas não alteraram o comprimento e ângulo de suas ligações.

No presente caso, o parâmetro escolhido para validar a metodologia de minimização dos ligantes de ADA foi o comprimento das ligações medidos a partir dos átomos pesados (carbono, nitrogênio e oxigênio) do cristal da molécula de adenosina, conforme mostrado na Figura 17.

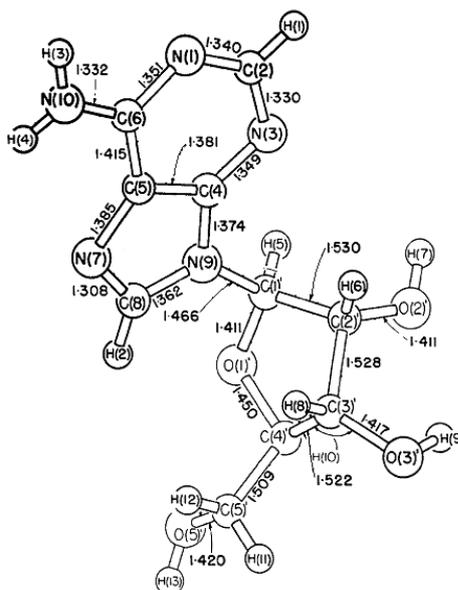


Figura 17 - Distâncias e ângulos das ligações dos átomos pesados da molécula de adenosina, com um desvio padrão de 0,003Å (adaptado de LAI & MARSH, 1972).

A Tabela 1 mostra os valores médios obtidos para o comprimento (em Å) de cada tipo de ligação da molécula de adenosina.

Ligação	Dados Exp.	AM1	MNDO	PM3	RM1	6-31G*
O-C _{sp3} (x5)	1,422	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4
C _{sp3} -C _{sp3} (x4)	1,522	1,525	1,6	1,575	1,575	1,6
C _{sp3} -N _{ar} (x1)	1,466	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5
C _{ar} -C _{ar} (x2)	1,398	1,45	1,4	1,4	1,4	1,4
N _{ar} -C _{ar} (x8)	1,350	1,3875	1,3875	1,375	1,3875	1,3875
C _{ar} -N _{sp3} (x1)	1,332	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4

Tabela 1 - Valores médios obtidos para o comprimento (em Å) para cada tipo de ligação dos átomos pesados da molécula de adenosina.

Analisando a tabela dos valores médios para o comprimento de cada tipo de ligação dos átomos pesados da molécula de adenosina, pode-se ver que todos os métodos computacionais apresentaram valores idênticos (1,4) para a média de comprimento das ligações O-C_{sp3} (1,422) e C_{ar}-N_{sp3} (1,332). Para a ligação C_{sp3}-C_{sp3} (1,522) o método que obteve valor mais próximo foi o AM1 (1,525). Para as ligações C_{sp3}-N_{ar} (1,466) e C_{ar}-C_{ar} (1,398) os métodos que apresentaram valores mais próximos foram MNDO, PM3, RM1 e 6-31G* (1,5 e 1,4, respectivamente). Para a ligação N_{ar}-C_{ar} (1,350) o método PM3 ficou próximo (1,375) do valor experimental.

Assim, o método PM3 foi aquele que resultou em valores de média de comprimento de ligações mais próximos ao experimental em 5 dos 6 tipos de ligações analisadas. Por essa

razão, o método escolhido para a minimização dos demais ligantes estudados foi o método semi-empírico PM3.

4.2 Validação da metodologia de ancoramento molecular

No caso da validação de métodos de ancoramento molecular, também se faz necessária a comparação com dados experimentais. No presente trabalho, utilizou-se a ADA humana e seu substrato co-cristalizado 2'-desoxiadenosina (código PDB: 3IAR), e cada uma das funções de ranqueamento disponíveis no programa GOLD 5.2, a saber ASP, CHEMPLP, CHEMscore e GOLDScore. O parâmetro escolhido para esta etapa de validação foi o valor de RMSD por comparação da conformação de 2'-desoxiadenosina co-cristalizada com ADA com a conformação obtida após a sua redocagem. A Tabela 2 mostra os valores de RMSD do composto 2'-desoxiadenosina obtidos para cada função de ranqueamento do programa GOLD 5.2.

Corrida	Valor de RMSD do resultado com melhor pontuação			
	ASP	CHEMPLP	CHEMscore	GOLDScore
1	0,529	0,468	0,960	0,696
2	0,512	0,444	0,959	0,710
3	0,535	0,454	1,144	0,600
4	0,552	0,484	1,012	0,707
5	0,517	0,500	1,101	0,628
6	0,451	0,462	0,982	0,585
7	0,522	0,469	1,130	0,627
8	0,531	0,453	0,929	0,660
9	0,508	0,487	0,898	0,689
10	0,487	0,477	1,030	0,694
Média	0,514	0,470	1,015	0,660

Tabela 2 - Valores de RMSD do composto 2'-desoxiadenosina obtidos para cada função de ranqueamento do programa GOLD 5.2.

A função de ranqueamento escolhida para os ensaios de ancoramento molecular foi a função CHEMPLP por apresentar uma média de valores de RMSD de 0,470, menor que as demais funções (ASP: 0,514; CHEMscore: 1,015; GOLDScore: 0,660), traduzindo assim uma melhor capacidade de reproduzir os dados experimentais.

4.3 Seleção de compostos semelhantes a partir de banco de dados e análise das interações

O estudo das interações entre proteínas e moléculas pequenas compreende etapa importante para a pesquisa farmacêutica, sendo o desenho de fármacos usualmente baseado

em relações de complementaridade identificadas entre as estruturas do alvo molecular e do ligante e os aspectos termodinâmicos das ligações (OLSSON et al., 2008).

4.3.1 Termodinâmica das interações

De forma geral, a inibição de uma enzima, isto é, a ligação não covalente do inibidor à enzima, ocorre somente quando há uma queda no valor de energia livre (ΔG), termo que é sabidamente conhecido como a soma do termo entálpico (ΔH) e do termo entrópico ($-T\Delta S$).

Quando informações cristalográficas estão disponíveis, é possível propor, a partir do complexo ligante-proteína, relações entre a geometria e a termodinâmica das interações. O comportamento tradicional em justificar atividades em interações visíveis cria uma dependência muito grande dos termos entálpicos, que acaba muitas vezes negligenciando a flexibilidade e cooperatividade do sistema (BISSANTZ et al., 2010).

O termo entrópico é importante para os estudos de modelagem por estar relacionado à solvatação e dessolvatação dos ligantes, uma vez que os sistemas biológicos são compostos de água e à restrição conformacional ocasionada pela associação entre enzima-inibidor, onde a medida que o inibidor se imobiliza na enzima, há uma diminuição no valor do termo entrópico (GOHLKE & KLEBE, 2002). Os estudos de modelagem molecular ainda não são capazes de determinar, satisfatoriamente, a contribuição entrópica envolvida na interação estudada.

4.3.2 Interações favoráveis e produtivas

Os estudos de ancoramento molecular são, na maioria dos trabalhos de modelagem molecular, utilizados para justificar as razões moleculares associadas à presença ou ausência de atividade de compostos a partir das interações favoráveis observadas.

Isso é tão verdade que quando do desenho de compostos novos, os cientistas partem do princípio que aumentando o número de interações com a proteína haverá um aumento na atividade desejada, pois se tem como verdadeira a premissa de que o reconhecimento molecular dos sistemas biológicos depende de interações específicas entre a biomacromolécula e a micromolécula.

É interessante notar que esse raciocínio funde dois conceitos muito similares, porém sutilmente distintos, o conceito de uma “interação favorável entalpicamente” e o de uma “interação produtiva para o efeito farmacológico desejado”. Uma interação é favorável quando, somente do ponto de vista termodinâmico, há complementaridade, como por

exemplo, interações de hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas, sem se preocupar com o efeito que essa interação exercerá na produção do efeito farmacológico estudado.

Uma interação favorável será produtiva quando ela for capaz de proporcionar uma melhora na atividade farmacológica ou fenômeno investigado. O ponto importante de se distinguir entre essas duas características relacionadas às interações entre uma micromolécula e uma biomacromolécula é que nem sempre uma interação favorável poderá ser considerada uma interação produtiva (BISSANTZ et al., 2010).

Como mencionado acima, uma limitação dos ensaios de ancoramento molecular, decorrente das funções de ranqueamento, é a dificuldade de considerar as variações entrópicas geradas pela imobilização de ligações decorrente das interações. Dessa forma, fica difícil que o ranqueamento previsto pelas funções utilizadas seja compatível com o observado experimentalmente.

Nesse cenário convém então estudar a enzima e seus inibidores para identificar quais interações favoráveis são de fato produtivas para o efeito inibitório desejado. A ideia por trás dessa estratégia é identificar quais são as diferenças de interação entre os compostos e o sítio ativo da enzima alvo e como essas diferenças são capazes de modificar os valores de K_i , para identificar assim quais interações são relevantes para o perfil de ligação de um inibidor.

Outra premissa utilizada no presente trabalho é que compostos estruturalmente semelhantes interagem com a ADA de forma semelhante. Assim, as diferenças estruturais serão responsáveis pela diferença do valor de K_i .

Diante do grande universo de compostos testados para a ADA na literatura, e das premissas acima, foram estabelecidos critérios para identificar compostos com uma diferença estrutural mínima e que possuem uma grande diferença nos valores de K_i .

É importante salientar que as comparações foram baseadas nos valores de pK_i para inibição das mesmas enzimas, ou seja, ainda que as estruturas fossem semelhantes de acordo com os critérios pré-estabelecidos, caso fosse descrito, por exemplo, uma constante de inibição para ADA humana para um composto e inibição da ADA bovina para o outro, o modo de interação não seria comparado, uma vez que os valores de pK_i variam entre as enzimas de diferentes espécies.

Aqui há a preocupação em fornecer informações para que a motivação de uma modificação estrutural, seja ela uma hibridização molecular ou uma troca bioisostérica, possa ser complementada por uma compreensão do ambiente e do comportamento do ligante, de

forma a aumentar a expectativa de sucesso da mudança estrutural proposta. Nesse caso, a ideia é saber, de antemão, se a modificação molecular teria chances de sucesso.

4.3.3 Análise comparativa

A análise dos resultados da base de dados ChEMBL gerou um total de 408 compostos relacionados à ADA murina, bovina e humana. Após a classificação de acordo com sua estrutura, os 408 compostos foram divididos conforme mostrado na Tabela 3.

Grupo	Quantidade de compostos
1A	7
1B	56
2A	105
2B	72
3A	12
3B	156

Tabela 3 - Quantidade de compostos relacionados à ADA obtidos na busca do ChEMBL, classificados por grupo estrutural.

Após isso, cada um dos compostos de cada grupo teve sua estrutura comparada com os demais integrantes do grupo, com o intuito de identificar semelhanças de acordo com os critérios previamente estabelecidos na Metodologia. A Figura 18 ilustra a tabela de comparação para o grupo 1B.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
10										
11	Grupo 1-B									
12										
13	Composto A	pKi	Composto B	pKi	Diferença					
14	CHEMBL13696	5,229	CHEMBL14106	4,268	0,962	0				
15	CHEMBL17825	7,456	CHEMBL17870	5,983	1,473	0				
16	CHEMBL17825	7,456	CHEMBL17889	6,434	1,022	0				
17	CHEMBL17825	7,456	CHEMBL17954	4,747	2,709	1				
18	CHEMBL17881	4,796	CHEMBL17889	6,434	1,638	0				
19	CHEMBL17881	4,796	CHEMBL17954	4,747	0,049	0				
20	CHEMBL17889	6,434	CHEMBL17954	4,747	1,687	0				
21	CHEMBL17870	5,983	CHEMBL18078	6,900	0,917	0				
22	CHEMBL17825	7,456	CHEMBL18078	6,900	0,556	0				
23	CHEMBL17881	4,796	CHEMBL18119	5,151	0,365	0				
24	CHEMBL17870	5,983	CHEMBL18131	4,975	1,008	0				
25	CHEMBL17881	4,796	CHEMBL18188	6,032	1,236	0				
26	CHEMBL17954	4,747	CHEMBL18188	6,032	1,284	0				
27	CHEMBL18119	5,161	CHEMBL18188	6,032	0,870	0				
28	CHEMBL17954	4,747	CHEMBL18586	4,440	0,307	0				
29	CHEMBL17889	6,434	CHEMBL18586	4,440	1,994	0				
30	CHEMBL13697	4,000	CHEMBL274888	4,000	0,000	0				
31	CHEMBL13696	5,229	CHEMBL327830	6,157	0,938	0				
32	CHEMBL17825	7,456	CHEMBL279149	5,396	2,060	1				
33	CHEMBL17825	7,456	CHEMBL276360	4,409	3,047	1				
34	CHEMBL17825	7,456	CHEMBL276073	5,592	1,864	0				
35	CHEMBL14106	4,268	CHEMBL274888	4,000	0,268	0				
36	CHEMBL62360	4,585	CHEMBL64503	5,745	1,160	0				
37	CHEMBL62541	3,000	CHEMBL64502	4,620	1,620	0				
38	CHEMBL64502	4,620	CHEMBL64503	5,745	1,125	0				
39	CHEMBL64502	4,620	CHEMBL65627	5,018	0,398	0				
40	CHEMBL62541	3,000	CHEMBL65628	6,523	3,523	1				
41	CHEMBL62360	4,585	CHEMBL65628	6,523	1,938	0				
42	CHEMBL64503	5,745	CHEMBL65628	6,523	0,778	0				
43	CHEMBL65627	5,018	CHEMBL65628	6,523	1,505	0				
44	CHEMBL18014	5,599	CHEMBL279149	5,396	0,203	0				
45	CHEMBL18131	4,975	CHEMBL276073	5,592	0,617	0				
46	CHEMBL93280	8,114	CHEMBL122016	5,836	2,277	1				
47	CHEMBL17954	4,747	CHEMBL440769	4,130	0,567	0				
48	CHEMBL18367	3,460	CHEMBL440769	4,130	0,721	0				
49	CHEMBL121939	7,959	CHEMBL420174	7,041	0,918	0				
50	CHEMBL121939	7,959	CHEMBL338076	7,523	0,436	0				
51	CHEMBL121714	7,420	CHEMBL338076	7,523	0,103	0				
52	CHEMBL93560	7,959	CHEMBL327830	6,157	1,791	0				
53	CHEMBL65628	6,523	CHEMBL292750	6,222	0,301	0				
54	CHEMBL64502	4,620	CHEMBL292750	6,222	1,602	0				

Figura 19 – Imagem da planilha contendo as duplas obtidas identificadas pela comparação estrutural, respectivos valores de pKi e diferença encontrada, estando valores maiores do que 2 realçados em vermelho.

A Tabela 4 a seguir mostra as 9 comparações que atenderam os critérios pré-estabelecidos anteriormente: semelhança estrutural e diferença de valor de pKi maior que 2 unidades para enzimas da mesma espécie. Os valores de pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular são também mostrados.

Composto	pKi	Pontuação	Composto	pKi	Pontuação	Diferença pKi
CHEMBL17825	7,456	76,99	CHEMBL279149	5,396	74,63	2,06
CHEMBL17825	7,456	76,99	CHEMBL276360	4,409	73,33	3,05
CHEMBL128787	6,721	60,43	CHEMBL17638	4,638	59,09	2,08
CHEMBL115824	7,000	74,24	CHEMBL604599	3,959	61,79	3,04
CHEMBL17822	4,149	67,93	CHEMBL18838	6,796	74,62	2,10
CHEMBL1651380	7,398	56,40	CHEMBL604016	5,155	51,73	2,24
CHEMBL104714	6,304	66,70	CHEMBL322906	8,328	74,67	2,02
CHEMBL1181766	9,000	83,86	CHEMBL364717	6,276	80,54	2,72
CHEMBL296435	8,699	70,08	CHEMBL321338	6,076	66,75	2,62

Tabela 4 - Compostos analisados e respectivos valores de pKi, pontuação e módulo da diferença de pKi.

4.3.3.1 ChEMBL279149 vs ChEMBL17825

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto ChEMBL17825 possui um grupo carboxamida ligado ao anel imidazólico (A) enquanto o composto ChEMBL279149 possui uma metilenoamina (A').

A Figura 20 mostra a estrutura de cada um dos compostos, nas quais a diferença estrutural está em evidência, bem como os valores de pKi e a pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Cristalli e colaboradores (1991).

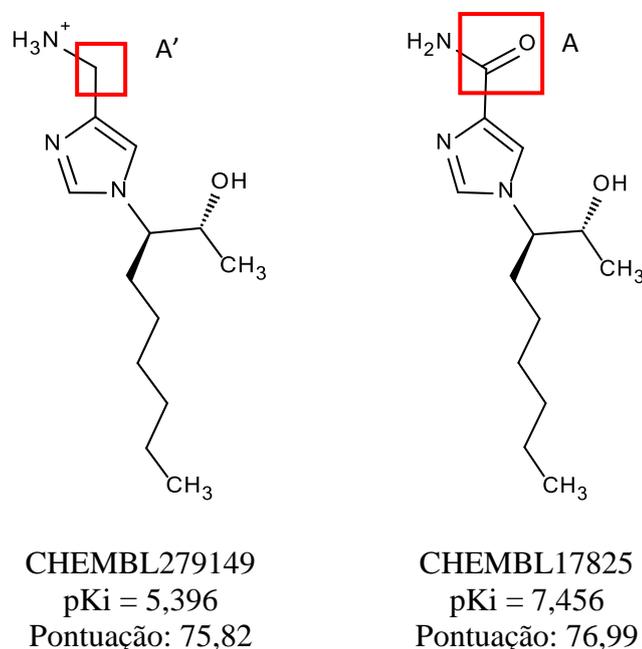


Figura 20 - Estrutura dos compostos ChEMBL279149 e ChEMBL17825, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

ChEMBL279149 possui em sua estrutura um grupo amino primário, o qual possui pKa calculado de 9,96. Assim, em pH fisiológico (7,4) a estrutura predominante será aquela na qual o grupo amino estará protonado.

A presença da carbonila na estrutura proporciona poses distintas para o composto ChEMBL17825 no sítio ativo da ADA humana quando comparado ao ChEMBL279149.

Os principais sítios de interação do composto ChEMBL17825 (amarelo) estão em destaque na Figura 21. Pode-se perceber que, embora a hidroxila da cadeia alquílica de ChEMBL17825 esteja próxima da carboxila de Asp19 (1,8 Å) e do anel imidazólico de

His17 (2,0 Å), somente a interação com a carboxila de Asp19 é favorável por possuir uma orientação adequada. O oxigênio da carbonila de CHEMBL17825 está em uma orientação adequada para a interação com o anel imidazólico de His238, porém a distância observada entre eles, 3,2 Å, torna essa interação pouco favorável. O hidrogênio do grupo amino de CHEMBL17825 apresenta orientação e distância (2,7 Å) adequadas para interação com a carboxila de Glu217, assim como o nitrogênio imidazólico de CHEMBL17825, que se encontra a 2,1 Å do hidrogênio do grupo amino da cadeia principal de Gly184. O átomo de oxigênio do grupo carboxamida está a uma distância de 2,5 Å do metal Zn^{+2} , distância essa maior que as comumente encontradas para esse tipo de ligação (2,08-2,15 Å) (ZHENG et al., 2008) de forma que tal interação não deve contribuir para o valor de pKi observado.

Os sítios de interação do composto CHEMBL279149 (magenta) também podem ser observados na Figura 21. O hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral de CHEMBL279149 está distante 2,2-2,9 Å da carboxila de Asp19 e o oxigênio da hidroxila da cadeia lateral de CHEMBL279149 está distante 2,3 Å do anel imidazólico de His17, ambos apresentando orientações inadequadas que desfavorecem as interações com Asp19 e His17. O grupo amino protonado de CHEMBL279149 apresenta, por sua vez, orientação e distância adequadas para interação: seus hidrogênios estão a distâncias de 2,1-2,9 Å da carboxila de Asp295 e a distâncias de 2,0-3,0 Å da carboxila de Glu217. CHEMBL279149 não realiza nenhuma interação com Gly184.

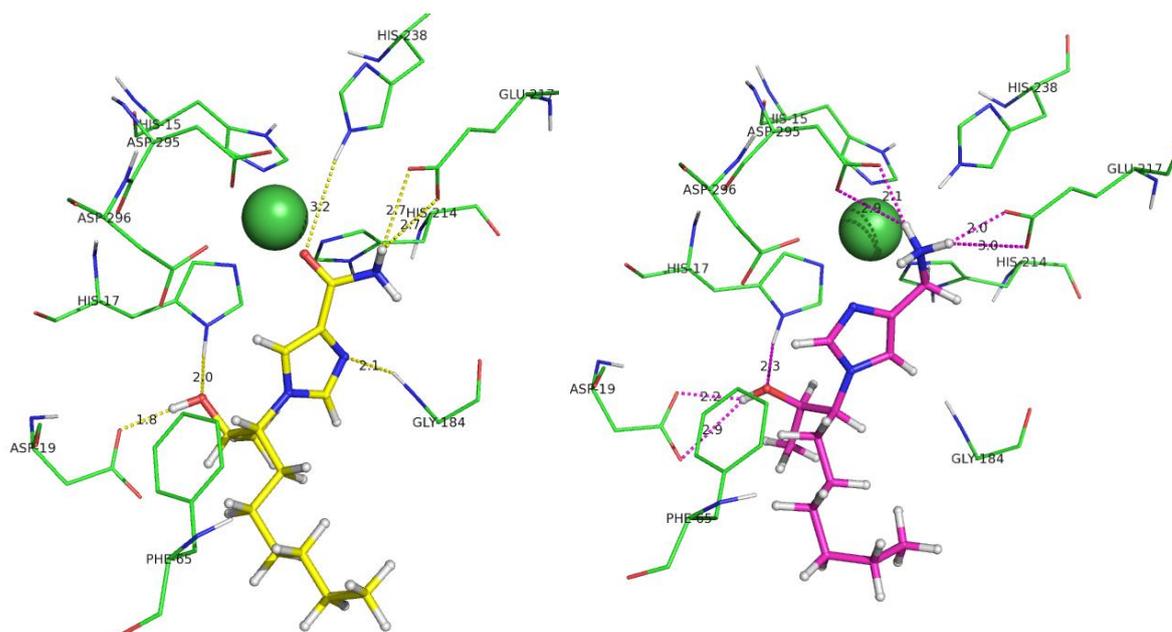


Figura 21 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17825 (amarelo) e CHEMBL279149 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

As diferenças observadas, como a interação favorável do hidrogênio da hidroxila da cadeia alquílica de CHEMBL17825 com a carboxila de Asp19 e também a interação do nitrogênio imidazólico de CHEMBL17825 com o grupo amino de Gly184, compensaram as interações do grupo amino protonado de CHEMBL279149 com Asp295 e Glu217, sendo consideradas responsáveis pela diferença de pKi observada.

4.3.3.2 CHEMBL276360 vs CHEMBL17825

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto CHEMBL17825 possui um grupo carboxamida ligado ao anel imidazólico (A) enquanto o composto CHEMBL276360 possui uma carboxila (A').

A Figura 22 mostra a estrutura de cada um dos compostos, estando a diferença estrutural em evidência, bem como os valores de pKi e da pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Cristalli e colaboradores (1991).

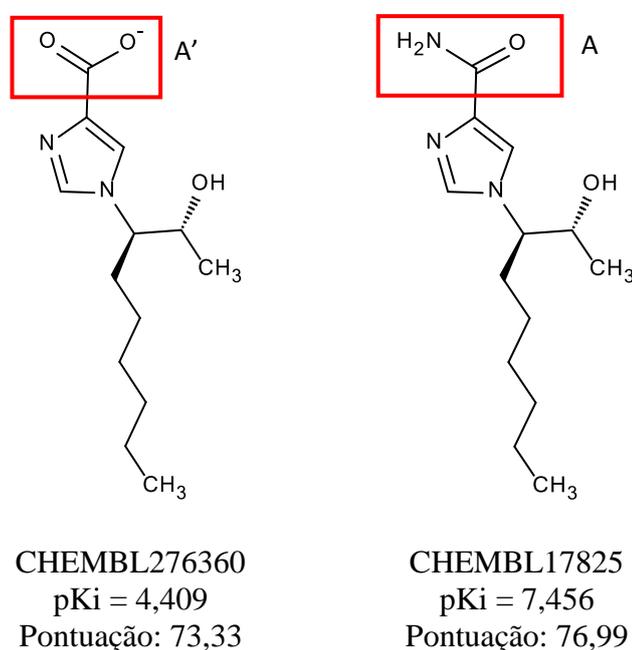


Figura 22 - Estrutura dos compostos CHEMBL279149 e CHEMBL17825, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

CHEMBL276360 possui em sua estrutura uma carboxila, a qual possui pKa calculado de 3,56. Assim, em pH fisiológico (7,4) a estrutura predominante será aquela na qual a

carboxila estará desprotonada. Embora CHEMBL17825 possua um grupo amino primário, em pH fisiológico este grupo não estará protonado.

A diferença estrutural observada proporciona poses bastante semelhantes para os compostos CHEMBL17825 e CHEMBL276360 no sítio ativo da ADA humana, conforme mostrado na Figura 23.

Os principais sítios de interação do composto CHEMBL17825 (amarelo) estão em destaque na Figura 23. Pode-se perceber que, embora a hidroxila da cadeia alquílica de CHEMBL17825 esteja próxima da carboxila de Asp19 (1,8 Å) e do anel imidazólico de His17 (2,0 Å), somente a interação com a carboxila de Asp19 possui uma orientação favorável. O oxigênio da carbonila de CHEMBL17825 está em uma orientação favorável para a interação com o anel imidazólico de His238, porém a distância entre eles, 3,2 Å, torna essa interação pouco provável. O hidrogênio do grupo carboxamida de CHEMBL17825 apresenta orientação e distância (2,7 Å) adequadas para interação com a carboxila de Glu217, assim como o nitrogênio imidazólico de CHEMBL17825, que encontra-se a 2,1 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184.

Os sítios de interação do composto CHEMBL276360 (ciano) também podem ser observados na Figura 23. O hidrogênio da hidroxila da cadeia lateral de CHEMBL276360 está distante 1,7 Å da carboxila de Asp19, apresentando uma orientação adequada para uma interação favorável com a carboxila de Asp19, enquanto que o oxigênio da hidroxila da cadeia lateral de CHEMBL276360 está distante 1,8 Å do anel imidazólico de His17, mas apresenta uma orientação que desfavorece a interação com o anel imidazólico de His17. O oxigênio da carboxila de CHEMBL276360 está em uma orientação adequada para a interação com o anel imidazólico de His238, porém a distância entre eles, 3,2 Å, não favorece esta interação. O nitrogênio imidazólico de CHEMBL276360 se encontra a 2,1 Å do hidrogênio do grupamento amino de Gly184 e em uma orientação adequada para que as interações de hidrogênio ocorram.

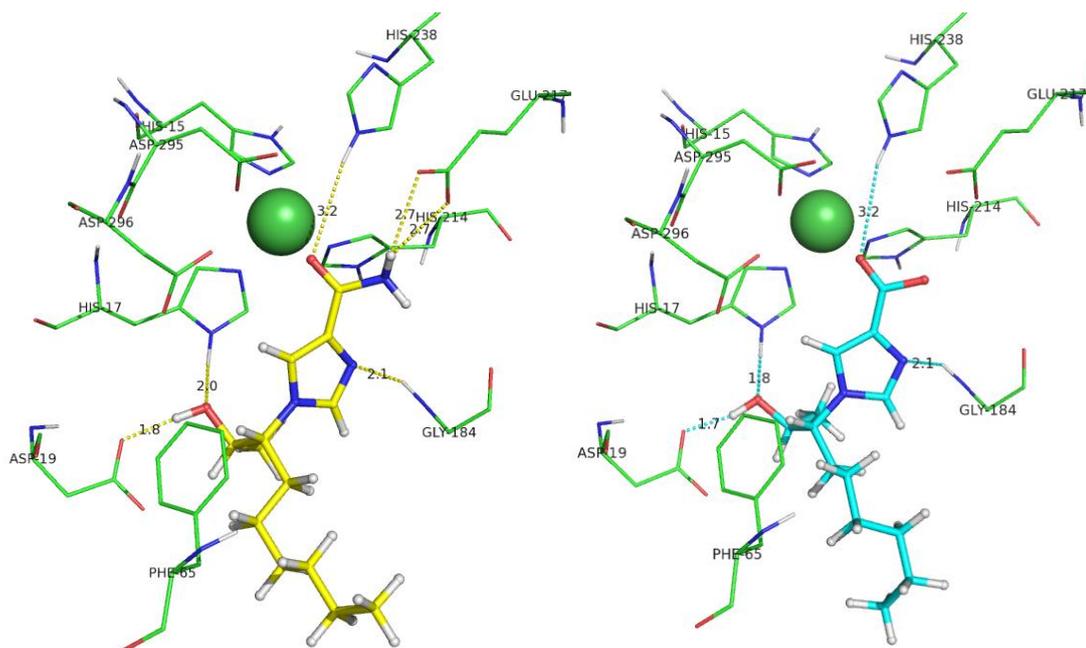


Figura 23 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17825 (amarelo) e CHEMBL276360 (ciano), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

A principal diferença observada nesse caso foi a interação favorável do hidrogênio do grupo amino da subunidade carboxamida de CHEMBL17825 com a carboxila de Glu217, sendo esta interação a principal responsável pela diferença de pKi observada.

4.3.3.3 CHEMBL128787 vs CHEMBL17638

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto CHEMBL17638 possui um átomo de cloro ligado à posição 5 do anel imidazo-piridínico (A), enquanto o composto CHEMBL128787 não possui nenhum substituinte nessa posição (A').

A Figura 24 mostra a estrutura de cada um dos compostos, com destaque para a diferença estrutural entre eles, bem como os valores de pKi e da pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Cristalli e colaboradores (1995).

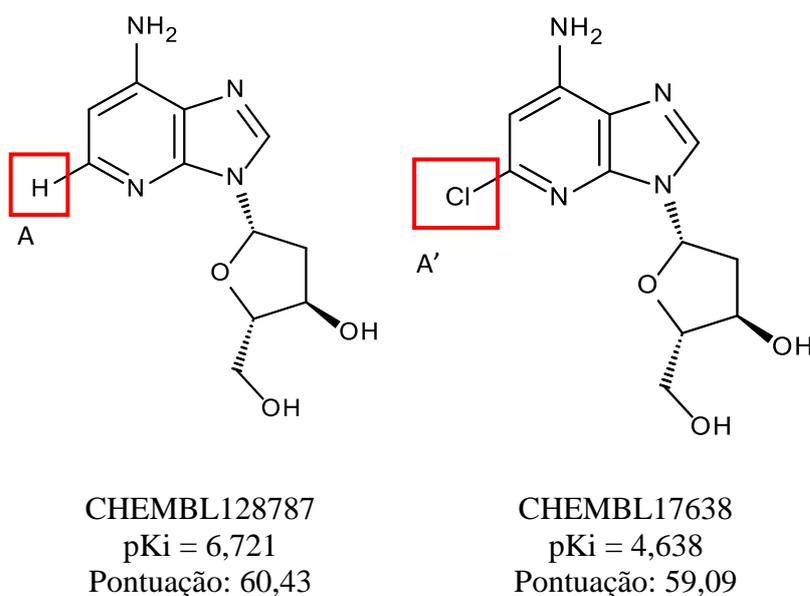


Figura 24 - Estrutura dos compostos CHEMBL128787 e CHEMBL17638, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

A diferença estrutural observada proporciona poses bastante semelhantes para os compostos CHEMBL128787 e CHEMBL17638 no sítio ativo da ADA humana, conforme mostrado na Figura 25.

Os principais sítios de interação do composto CHEMBL17638 (amarelo) estão em destaque na Figura 25. Pode-se observar que a hidroxila do anel oxolânico de CHEMBL17638 está próxima da carboxila de Asp19 (1,8 Å) e possui uma orientação que proporciona uma interação favorável. Os hidrogênios do grupamento amino de CHEMBL17638 apresentam orientação e distância adequadas para interação com as carboxilas de Glu217 (2,0 Å) e Asp295 (2,0 e 2,6 Å). O nitrogênio piridínico de CHEMBL17638 se encontra a 2,0 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184.

Os principais sítios de interação do composto CHEMBL128787 (magenta) estão em destaque na Figura 25. Pode-se observar que a hidroxila do anel oxolânico de CHEMBL128787 está próxima da carboxila de Asp19 (2,1 Å) e possui uma orientação que proporciona uma interação favorável. Os hidrogênios do grupamento amino de CHEMBL128787 apresentam orientação e distância adequadas para interação com as carboxilas de Glu217 (1,9 Å) e Asp295 (2,3 Å). O nitrogênio piridínico de CHEMBL128787 se encontra a 1,8 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184.

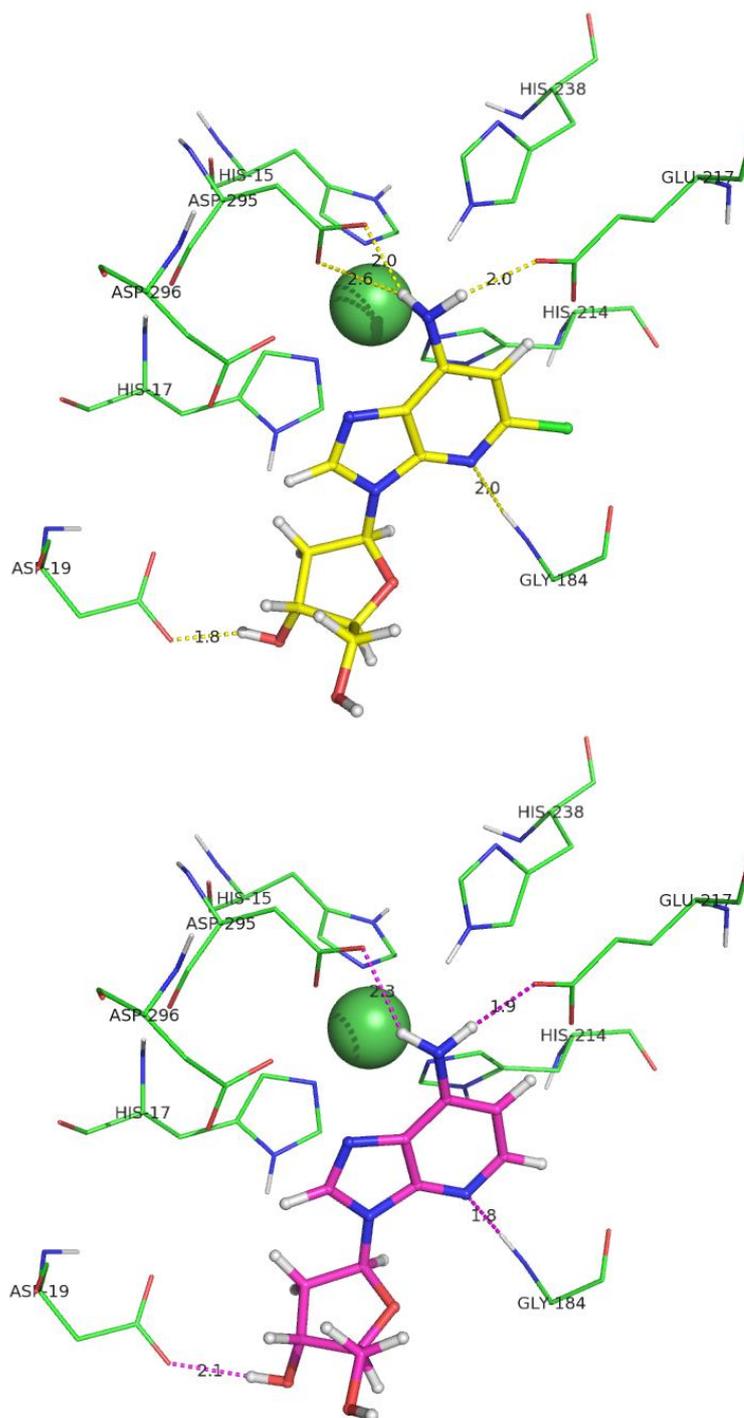


Figura 25 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17638 (amarelo) e CHEMBL128787 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

Considerando que as interações apresentadas pelos compostos CHEMBL128787 e CHEMBL17638 com o sítio ativo da ADA humana são bem semelhantes e que a diferença entre os compostos CHEMBL128787 e CHEMBL17638 reside em um átomo de cloro, postulou-se que a presença do átomo de cloro em CHEMBL17638 poderia diminuir a disponibilidade dos elétrons para a realização de interações com o sítio ativo da ADA, uma

vez que ele possui uma eletronegatividade maior que a do átomo de hidrogênio de CHEMBL128787. Assim, foi avaliado o impacto que a presença do átomo de cloro causou na densidade eletrônica relativa dos nitrogênios piridínicos de CHEMBL128787 e CHEMB17638 (Figura 26).

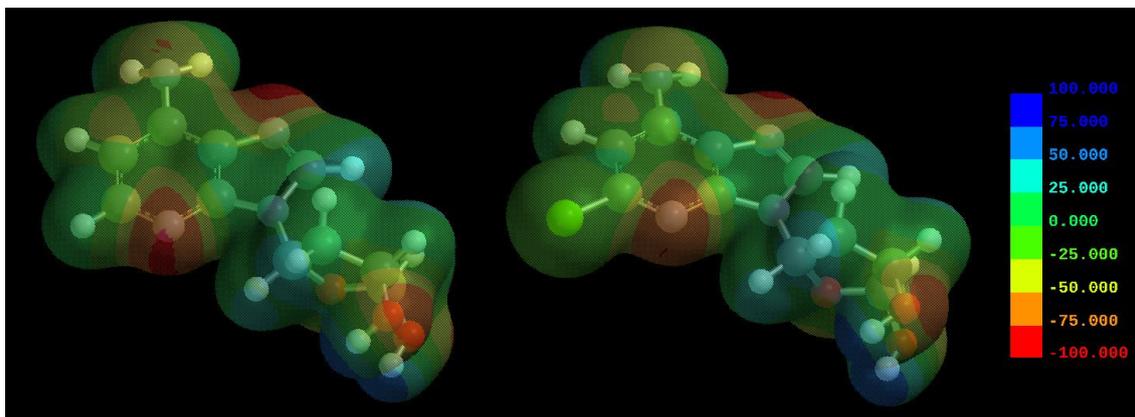


Figura 26 - Mapa da densidade eletrônica de CHEMBL128787 (esquerda) e CHEMBL17638 (direita), mostrando a variação da densidade eletrônica no átomo de nitrogênio piridínico e no átomo de nitrogênio do grupo amino.

Foi possível observar que a densidade eletrônica do nitrogênio piridínico e do grupo amino é maior em CHEMBL128787, composto que não possui o átomo de cloro. Portanto, espera-se que as interações entre o nitrogênio piridínico de CHEMBL128787 e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 sejam mais intensas que as interações entre o nitrogênio piridínico de CHEMBL17638 e o hidrogênio do grupamento amino de Gly184, e postula-se que essa diferença de densidade eletrônica possa ser responsável pela diferença de pKi observada entre esses dois compostos.

4.3.3.4 CHEMBL115824 vs CHEMBL604599

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto CHEMBL115824 possui um anel imidazo-piridínico (A) enquanto o composto CHEMBL604599 possui um anel benzimidazólico (A').

A Figura 27 mostra a estrutura de cada um dos compostos, estando a diferença estrutural em evidência, bem como os valores de pKi e da pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Cristalli e colaboradores (1991).

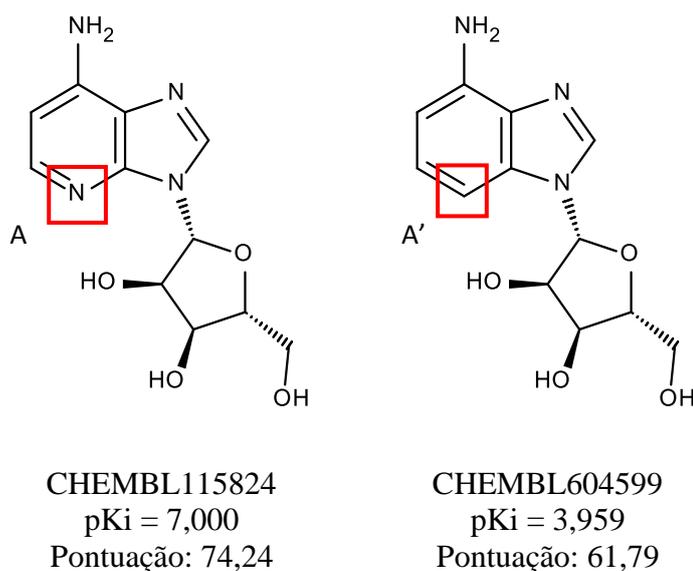


Figura 27 - Estrutura dos compostos CHEMBL115824 e CHEMBL604599, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

A análise do ancoramento molecular mostra que a pose gerada para cada um dos compostos é bem semelhante, estando a diferença de interação relacionada com a posição específica de alguns grupos funcionais.

A Figura 28 permite visualizar a interação realizada pelo grupo amino de CHEMBL115824, no qual um dos hidrogênios ligados ao grupo amino interage com a carboxila de Asp295, distante 2,0 Å e o nitrogênio do grupo amino interage com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His238, distante 2,7 Å, estando ambas interações em orientações adequadas. Os hidrogênios das hidroxilas ligadas às posições 2 e 3 do anel oxolânico de CHEMBL115824 são capazes de interagir com a carboxila de Asp19, em distâncias de 1,9 e 2,1 Å, e o oxigênio da hidroxila ligada à posição 2 é capaz de interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His17, distante 1,8 Å. Embora o nitrogênio piridínico esteja a uma distância de 2,1 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184, não apresenta uma orientação adequada para uma interação favorável.

As interações realizadas por CHEMBL604599, ilustradas na Figura 28, consistem de interações entre os hidrogênios do grupo amino e as carboxilas de Asp295, distante 2,0 Å, e de Asp296, distante 2,1 Å. O nitrogênio do grupo amino está a uma distância de 2,9 Å do hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His238 e não apresenta uma orientação que favoreça a interação. Quanto ao grupo oxolânico de CHEMBL604599, observa-se um posicionamento diferente para as hidroxilas, em especial para a subunidade hidroximetila

ligada na posição 2 do anel oxolânico. Este grupo apresenta uma conformação na qual o oxigênio não é capaz de interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His17 enquanto que o hidrogênio está a uma distância de 2,0 Å da carboxila de Asp19.

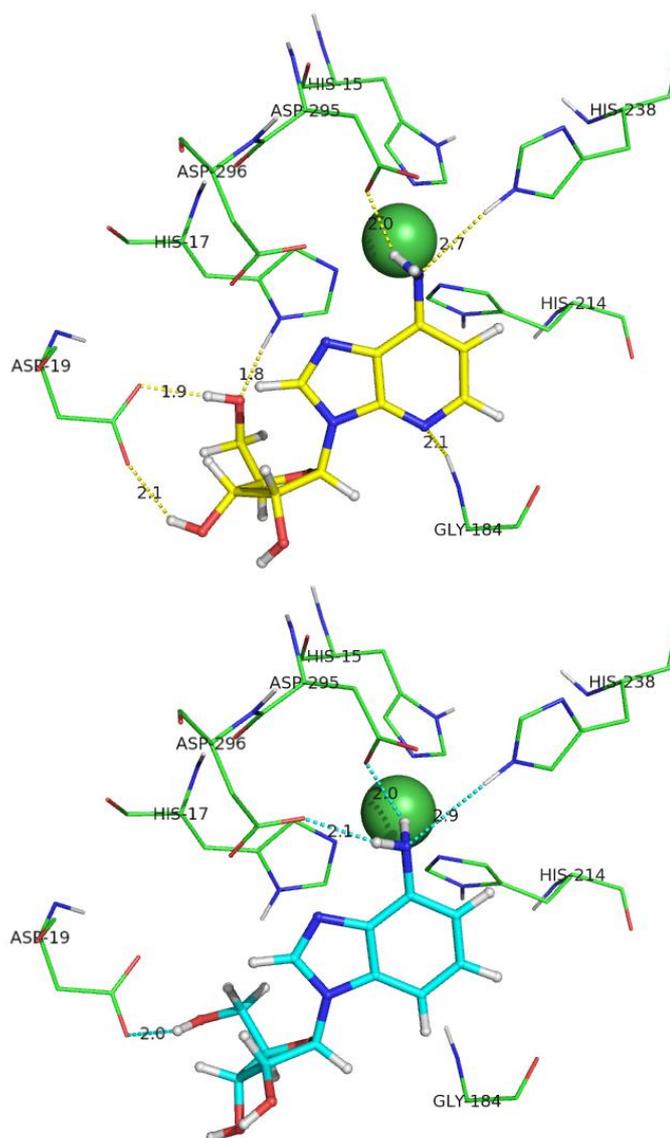


Figura 28 - Diferença do modo de interação de CHEMBL115824 (amarelo) e CHEMBL604599 (ciano), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

As principais diferenças observadas foram as interações favoráveis entre o nitrogênio do grupo amino CHEMBL115824 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His238, bem como entre o oxigênio da hidroxila ligada à posição 2 do anel oxolânico e o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His17.

Ainda que não tenha sido possível observar uma orientação favorável para que o nitrogênio piridínico de CHEMBL115824 e o hidrogênio do grupo amino de Gly184

interajam, é possível que mudanças conformacionais do sítio ativo da enzima, provocadas pelo ajuste induzido, permitam a correta orientação para esta interação.

4.3.3.5 ChEMBL17822 vs ChEMBL18838

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto ChEMBL17822 possui um anel benzimidazólico (A) enquanto o composto ChEMBL18838 possui um anel imidazo[4,5-*b*]piridínico (A').

A Figura 29 mostra a estrutura de cada um dos compostos, estando a diferença estrutural em evidência, bem como os valores de pKi e a pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Antonini e colaboradores (1984).

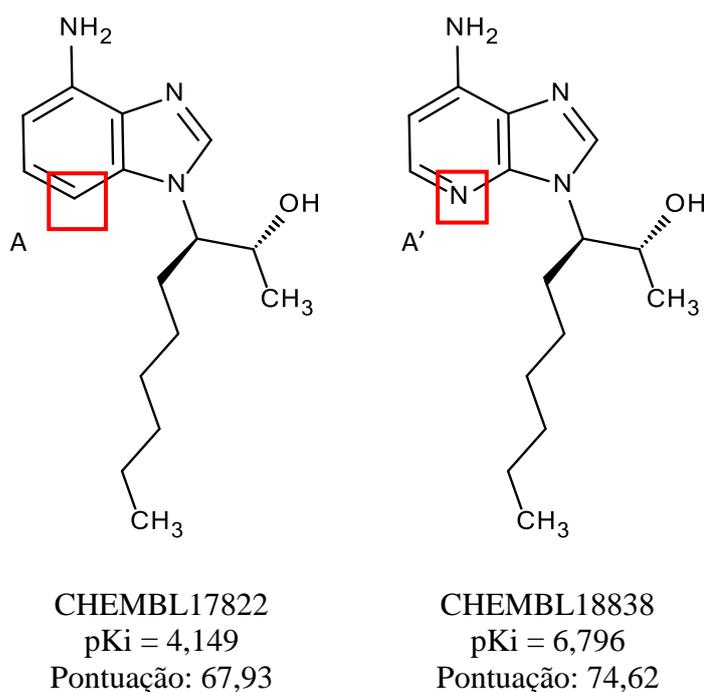


Figura 29 - Estrutura dos compostos ChEMBL17822 e ChEMBL18838, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

A Figura 30 mostra o modo de interação do composto ChEMBL17822, no qual o hidrogênio da hidroxila é capaz de interagir com a carboxila de Asp19, localizada a 1,9 Å de distância, e o oxigênio da hidroxila não possui uma orientação que permita interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His17. Além disso, é possível observar que os hidrogênios do grupo amino de ChEMBL17822 possuem orientação adequada para interagir

com as carboxilas de Asp296 e Glu217, mas somente a carboxila de Asp296 apresenta uma distância adequada para interação (1,9 Å), estando a carboxila de Glu217 distante 3,6 Å. O nitrogênio do grupo amino não apresenta orientação adequada para interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His238.

O modo de interação de CHEMBL18838, mostrado na Figura 30, indica que o hidrogênio da hidroxila possui orientação para que possa interagir com a carboxila de Asp19, localizada a 2,1 Å. O oxigênio da hidroxila não possui uma orientação que permita interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His17. Também é possível observar as interações do grupo amino de CHEMBL18838: ambos os hidrogênios interagem com a carboxila de Asp295, distante 2,1 e 2,6 Å. O nitrogênio do grupo amino de CHEMBL18838 também possui orientação adequada para interação com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His238, localizado a 2,7 Å de distância. Embora o nitrogênio piridínico esteja a uma distância de 2,2 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184, não apresenta uma orientação adequada para uma interação favorável.

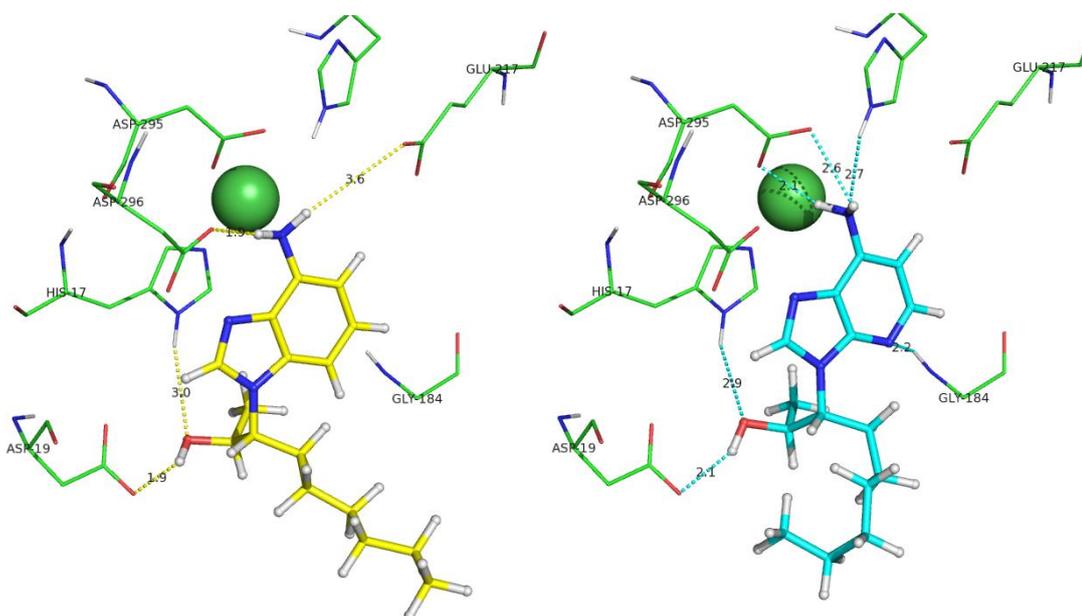


Figura 30 - Diferença do modo de interação de CHEMBL17822 (amarelo) e CHEMBL18838 (ciano), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

As principais diferenças observadas foram decorrentes das diferentes posições adotadas pelos respectivos grupos amino dos compostos analisados e a posição de CHEMBL18838 permitiu interações adicionais com His238 e com Asp295.

Ainda que não tenha sido possível observar uma orientação favorável para que o nitrogênio piridínico de CHEMBL18838 e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 interajam, é possível que mudanças conformacionais do sítio ativo da enzima, provocadas pelo ajuste induzido, permitam a correta orientação desta interação.

4.3.3.6 CHEMBL1651380 vs CHEMBL604016

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto CHEMBL604016 possui um anel purínico (A) enquanto o composto CHEMBL1651380 possui um anel 1,2,3-triazolo[4,5-*d*]pirimidínico (A').

A Figura 31 mostra a estrutura de cada um dos compostos, estando a diferença estrutural em evidência, bem como os valores de pKi e a pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Gillerman e Fischer (2011).

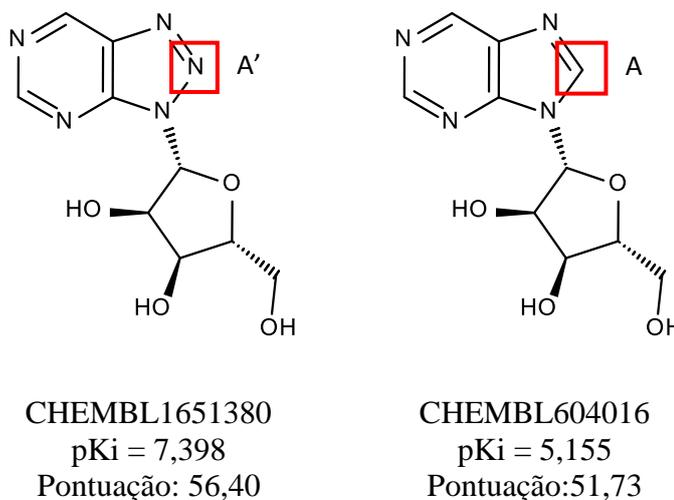


Figura 31 - Estrutura dos compostos CHEMBL1651380 e CHEMBL604016, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

A análise do resultado do ancoramento molecular dos dois compostos mostra poses muito semelhantes no sítio ativo da enzima. A Figura 32 permite visualizar que os hidrogênios das hidroxilas ligadas às posições 3 e 4 do anel oxolânico de CHEMBL1651380 são capazes de interagir com a carboxila de Asp19, em distâncias de 1,8 e 2,1 Å, e o oxigênio da hidroxila ligada à posição 4 não possui uma orientação que permita interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His17. Além disso, é possível observar que o

nitrogênio pirimidínico de CHEMBL1651380 possui orientação adequada para interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His238, que está localizado a uma distância de 3,2 Å. Por fim, percebe-se que o nitrogênio triazólico N3 está a 1,6 Å de distância do hidrogênio do grupo amino de Gly184 e possui uma orientação adequada para uma interação favorável.

A Figura 32 permite a visualização de interações bem semelhantes para CHEMBL604016. Somente o hidrogênio da hidroxila da posição 4 do anel oxolânico possui orientação para que possa interagir com a carboxila de Asp19, localizada em distâncias que variam de 2,1 a 2,7 Å. O oxigênio da hidroxila da posição 4 do anel oxolânico não possui orientação para que possa interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His17, embora esteja a uma distância de 2,1 Å. Também é possível observar que o nitrogênio pirimidínico de CHEMBL604016 possui orientação adequada para interagir com o hidrogênio ligado ao nitrogênio imidazólico de His238, que está localizado a uma distância de 2,9 Å. Por fim percebe-se que um dos nitrogênios imidazólicos está a 1,6 Å de distância do hidrogênio do grupo amino de Gly184 e também possui uma orientação adequada para uma interação favorável.

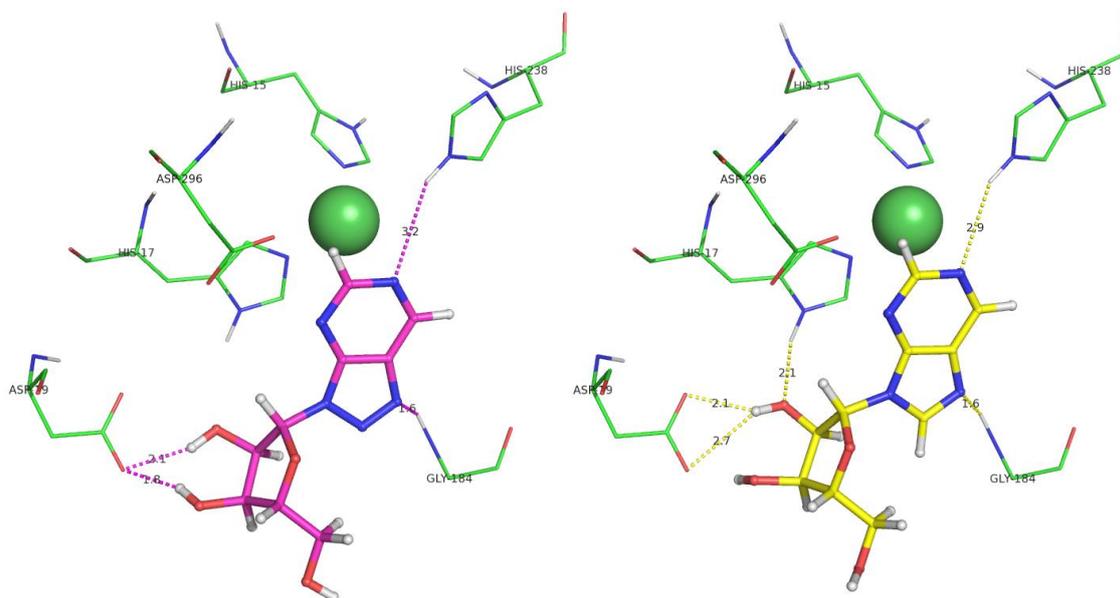


Figura 32 - Diferença do modo de interação de CHEMBL1651380 (magenta) e CHEMBL604016 (amarelo), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

A principal diferença observada foi a menor distância da interação entre os hidrogênios das hidroxilas ligadas ao anel oxolânico de CHEMBL1651380 e a carboxila de Asp19. Além disso, CHEMBL1651380 mostrou uma pose na qual 2 hidroxilas realizam uma

interação favorável com a carboxila de Asp19 enquanto que CHEMBL604016 apresenta uma pose na qual somente uma das hidroxilas é capaz de interagir com a carboxila de Asp19.

Embora o ensaio de ancoramento molecular não tenha sido capaz de observar nenhuma interação específica para o nitrogênio N8 do anel 8-azapurínico que possa ser considerada como responsável pela diferença de pKi observada, é possível postular que o anel triazólico de CHEMBL1651380 possui, devido ao átomo adicional de nitrogênio, uma densidade eletrônica maior que o anel imidazólico de CHEMBL604016 e dessa forma realize uma interação de hidrogênio mais intensa com Gly184 quando comparada com a interação do anel imidazólico, e resulte em um valor de pKi maior para CHEMBL1651380.

Estudos de Ford e colaboradores (2000) mostraram que a ADA possui uma preferência por nucleosídeos possuindo conformações *anti*-. Logo, uma possível explicação para essa diferença de atividade pode ser devido à ausência de restrição para a rotação da ligação entre o nitrogênio e o carbono do anel oxolânico, permitindo a interconversão entre as formas *sin*- e *anti*- com mais facilidade no composto contendo o anel triazólico - CHEMBL1651380 (SINGH et al, 1974). Considerando que, devido a facilidade de rotação de CHEMBL1651380 proporcionada pelo anel triazólico, o equilíbrio das formas *sin*- e *anti*- ocorra com mais facilidade, é de se esperar que a proporção da população *anti*- seja favorecida em CHEMBL1651380.

4.3.3.7 CHEMBL104714 vs CHEMBL322906

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto CHEMBL104714 possui o substituinte 1,2-diidroxí-3-nonila (A) enquanto o composto CHEMBL322906 possui o substituinte 1-fluor-2-hidroxi-3-nonila (A').

A Figura 33 mostra a estrutura de cada um dos compostos, estando a diferença estrutural em evidência, bem como os valores de pKi e a pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Harriman e Abushanab (1994).

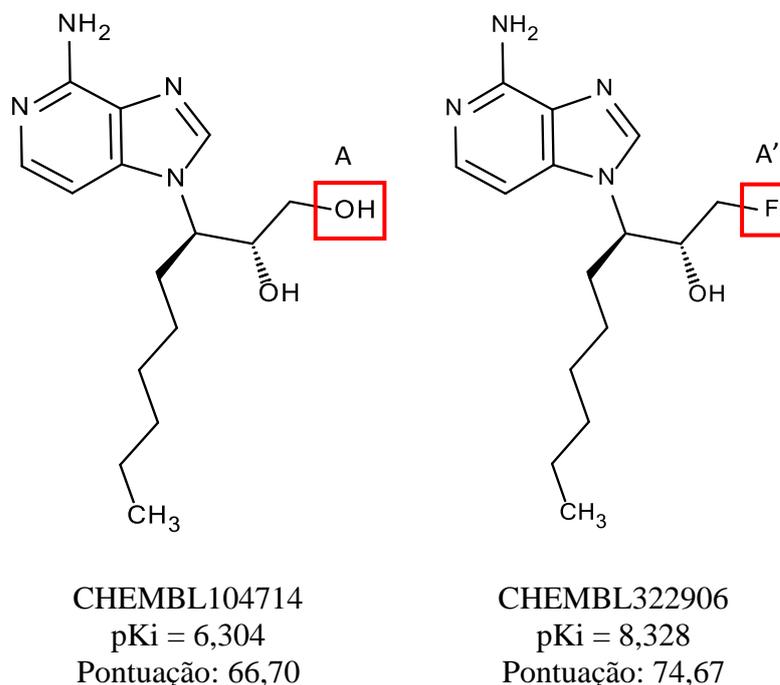


Figura 33 - Estrutura dos compostos CHEMBL104714 e CHEMBL322906 com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

A Figura 34 mostra a pose do composto CHEMBL104714 e as principais interações realizadas com os resíduos do sítio ativo da ADA. Observa-se que o hidrogênio do grupo amino de CHEMBL104714 é capaz de interagir com a carboxila de Asp295, a qual se encontra a 2,3 Å de distância. Em relação às hidroxilas de CHEMBL104714, é possível observar que o hidrogênio da hidroxila da posição 2 é capaz de interagir com a carboxila de Asp19. A mesma interação é também observada entre o hidrogênio da hidroxila da posição 1 e a carboxila de Asp19, em distâncias que variam de 2,3 a 3,1 Å. Embora a distância entre o oxigênio da hidroxila na posição 1 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His17 seja favorável a uma interação (1,7 Å), ele não se encontra em uma orientação adequada.

Ao observar o modo de ligação de CHEMBL322906 a partir da Figura 34, pode-se perceber que tanto os hidrogênios quanto o nitrogênio são capazes de realizar interações com o sítio ativo da ADA. Os hidrogênios interagem com as carboxilas de Asp295, a qual está a uma distância de 2,3 Å, e de Glu 217, a qual está a uma distância de 2,9 Å, e o nitrogênio interage com o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238, localizado a 2,6 Å de distância. Assim como para CHEMBL104714, o hidrogênio da hidroxila da posição

2 de CHEMBL322906 e a carboxila de Asp19 apresentam distância (1,9 e 2,6 Å) e orientação adequadas, sendo esta uma interação favorável. Por sua vez, o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His17 não se encontra em uma orientação adequada para interação com o oxigênio da hidroxila na posição 2. O átomo de flúor está localizado em uma região na qual o contato mais próximo para uma interação de hidrogênio é a sulfidril de Cys153, a qual se encontra a 3,4 Å de distância, distância essa insuficiente para a realização desta interação.

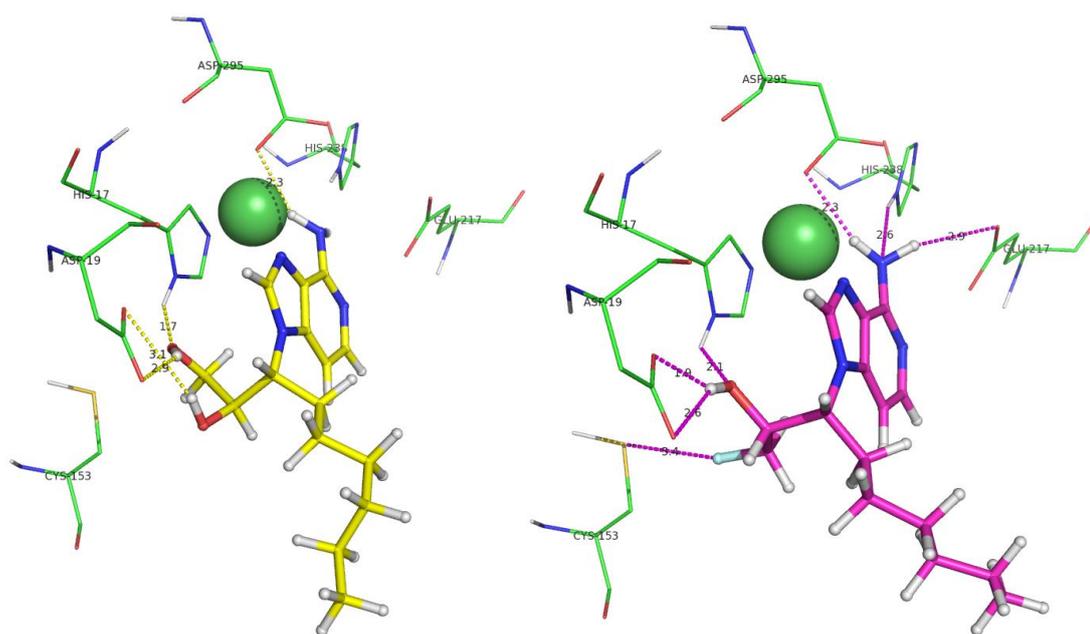


Figura 34 - Diferença do modo de interação de CHEMBL104714 (amarelo) e CHEMBL322906 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

A análise mostrou que é possível que as interações adicionais realizadas pelo grupo amino de CHEMBL322906 compensem as interações realizadas pelas hidroxilas de CHEMBL104714.

4.3.3.8 CHEMBL1181766 vs CHEMBL364717

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto CHEMBL364717 possui o substituinte n-octila (A) enquanto o composto CHEMBL1181766 possui o substituinte 2-hidroxi-1-octila (A').

A Figura 35 mostra a estrutura de cada um dos compostos, estando a diferença estrutural em evidência, bem como os valores de pKi e a pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. Os valores de pKi foram obtidos do trabalho de Da Settimo e colaboradores (2005).

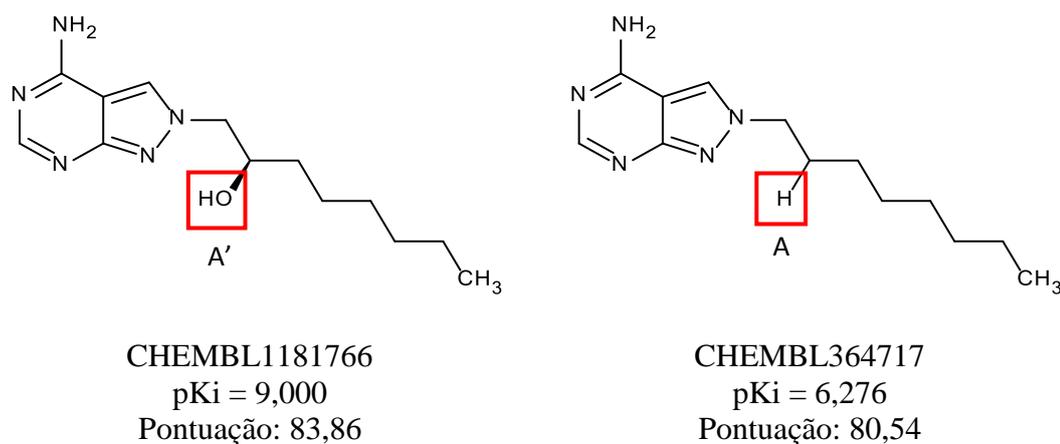


Figura 35 - Estrutura dos compostos CHEMBL1181766 e CHEMBL364717, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

A análise do ancoramento molecular mostra que a pose gerada para cada um dos compostos em análise é bem semelhante, estando a diferença de interação relacionada com a diferença estrutural apontada.

A Figura 36 mostra em detalhes as interações realizadas por CHEMBL1181766. O hidrogênio do grupo amino é capaz de interagir com a carboxila de Asp296, localizada a uma distância de 2,0 Å, o hidrogênio da hidroxila é capaz de interagir com a carboxila de Asp19, localizada a 1,7 Å de distância e o nitrogênio pirimidínico está a 1,7 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184, mas não apresenta uma orientação adequada para uma interação.

As interações de CHEMBL364717, mostradas na Figura 36, apontam uma interação favorável entre o hidrogênio do grupo amino e a carboxila de Asp296, localizada a uma distância de 2,1 Å e assim como em CHEMBL1181766, o nitrogênio pirimidínico está a 1,9 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184, e não apresenta uma orientação adequada para uma interação.

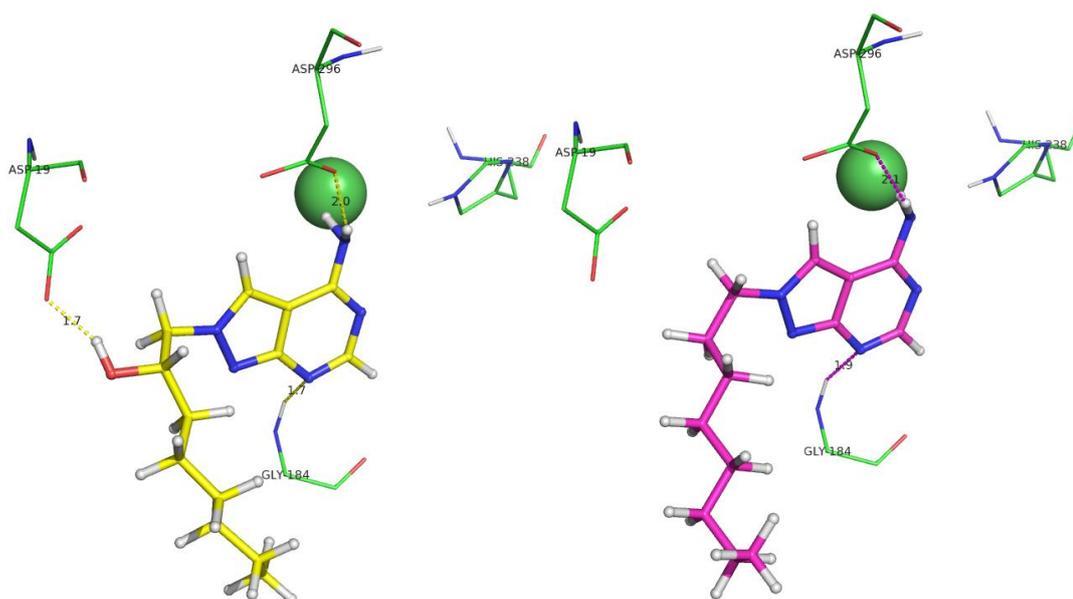


Figura 36 - Diferença do modo de interação de CHEMBL1181766 (amarelo) e CHEMBL364717 (magenta) e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

Fica claro pela inspeção visual das poses obtidas (Figura 36) que a hidroxila inserida em CHEMBL364717 é capaz de interagir com a carboxila de Asp19, de forma que essa interação é uma interação favorável e também produtiva, uma vez que proporciona uma redução no valor de pKi em 2,7 unidades.

4.3.3.9 CHEMBL296435 vs CHEMBL321338

A diferença estrutural destes inibidores reside no fato de que o composto CHEMBL296435 possui um grupo amino como substituinte na posição 6 do anel purínico (A) enquanto o composto CHEMBL321338 não apresenta tal substituinte (A').

A Figura 37 mostra a estrutura de cada um dos compostos, estando a diferença estrutural em evidência, bem como os valores de pKi e a pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular. O valor de pKi de CHEMBL296435 foi obtido do trabalho de Curis e colaboradores (1998), enquanto o valor de pKi de CHEMBL321338 foi obtido do trabalho de Antonini e colaboradores (1984).

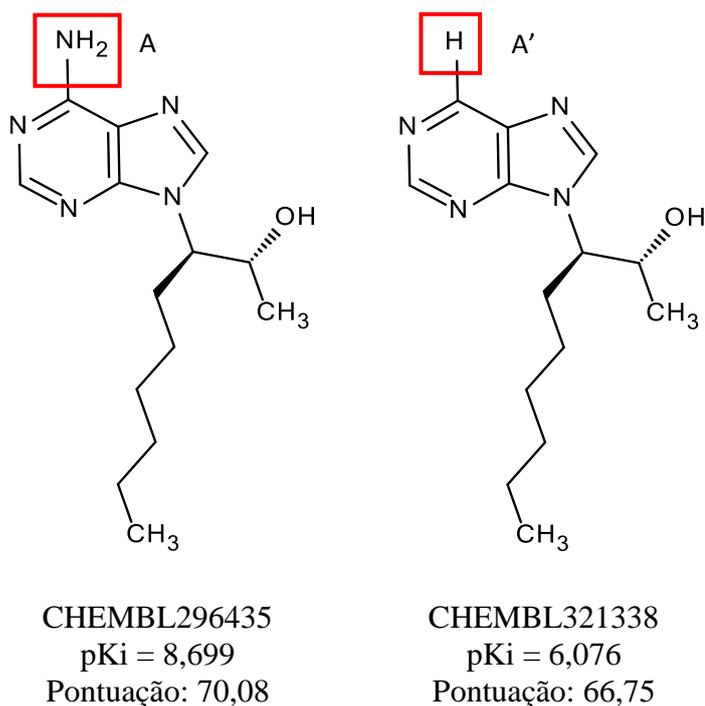


Figura 37 - Estrutura dos compostos CHEMBL296435 e CHEMBL321338, com a diferença entre as estruturas destacada pelo quadrado vermelho, e seus respectivos valores de pKi e pontuação obtidos nos ensaios de ancoramento molecular.

A análise do ancoramento molecular mostra que a diferença estrutural gerou modos de interação de CHEMBL296435 e de CHEMBL321338 bem distintos.

A Figura 38 mostra em detalhes as interações realizadas por CHEMBL296435. Os hidrogênios do grupo amino são capazes de interagir com a carboxila de Asp295, localizada a uma distância de 2,3 Å, e com a carboxila de Glu217, localizada a 2,3 Å. O nitrogênio do grupo amino não apresenta uma orientação adequada para que possa interagir de maneira favorável com o hidrogênio do nitrogênio imidazólico de His238. O hidrogênio da hidroxila é capaz de interagir com a carboxila de Asp19, localizada a 2,1-2,6 Å de distância, enquanto que o oxigênio da hidroxila não apresenta uma orientação adequada para que possa interagir de maneira favorável com o hidrogênio do nitrogênio imidazólico de His17. Da mesma forma, o nitrogênio pirimidínico, a 2,2 Å do hidrogênio do grupo amino de Gly184, não apresenta uma orientação adequada para uma interação.

A ausência do grupo amino em CHEMBL321338 mostra uma posição do inibidor bem diferente da posição de CHEMBL296435. É possível observar pela Figura 38 que o hidrogênio da hidroxila é capaz de interagir com a carboxila de Asp19, localizada a 1,9-3,0 Å de distância, enquanto que o oxigênio da hidroxila não apresenta uma orientação adequada para que possa interagir de maneira favorável com o hidrogênio do nitrogênio imidazólico de

His17. O hidrogênio do grupo amino de Gly184 apresenta orientação e distância (1,6 Å) adequadas para interação com o nitrogênio N7 do anel purínico e o hidrogênio do nitrogênio do anel imidazólico de His238, embora em orientação adequada, encontra-se distante do nitrogênio N1 do anel purínico para que ocorra uma interação favorável.

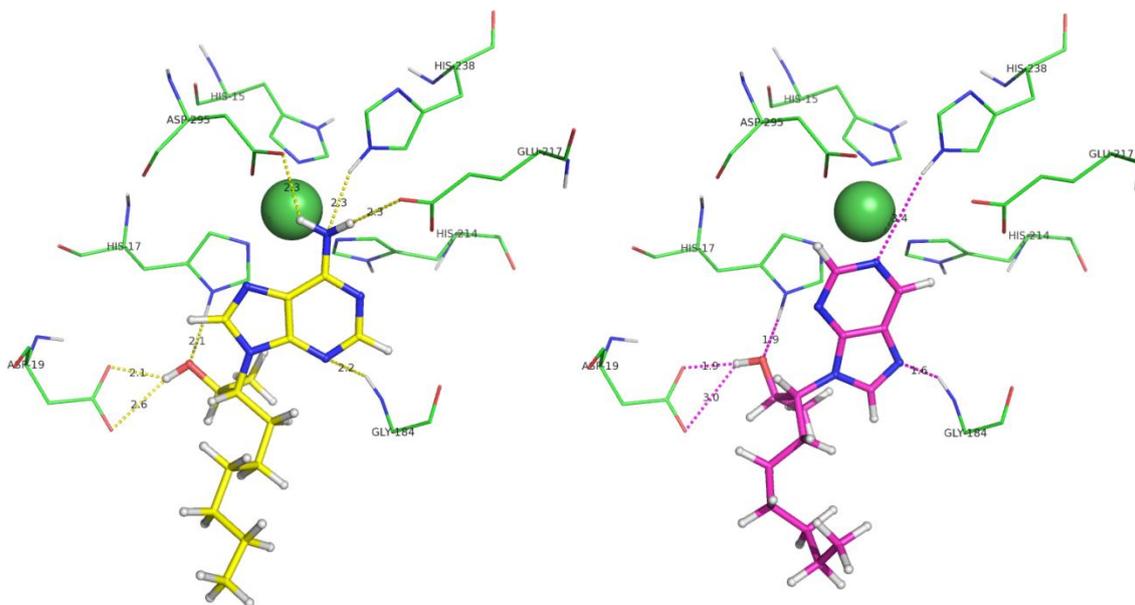


Figura 38 - Diferença do modo de interação de CHEMBL296435 (amarelo) e CHEMBL321338 (magenta), e suas respectivas distâncias aos resíduos do sítio ativo da ADA humana.

Fica claro pela inspeção visual das poses obtidas (Figura 38) que a presença do grupo amino em CHEMBL296435, capaz de funcionar com aceitor e doador de ligações de hidrogênio, gera interações favoráveis com Asp295 e Glu217, interações estas consideradas produtivas para o efeito inibitório da ADA.

Condensando as informações obtidas pelas análises acima, juntamente com as interações consideradas importantes a partir dos trabalhos de Terasaka e colaboradores (2003), (2004), (2005), Da Settimo e colaboradores (2005) e La Motta e colaboradores (2009), as principais interações produtivas para desenho de inibidores estão listadas a seguir e mostradas na Figura 39:

- Interações com o grupo amino da cadeia principal de Gly184;
- Interações com o hidrogênio do anel imidazólico de His17 e His238;
- Interações com a carboxila de Glu217;
- Interações com a carboxila de Asp19;

- Interações com a carboxila de Asp295 e Asp296;
- Bolsão hidrofóbico composto por Leu58, Phe61, Leu62, Phe65.

O bolsão hidrofóbico só é aparente quando o ligante é volumoso a ponto de interferir com as interações entre Leu58 e Asp185, expondo assim os sítios hidrofóbicos F1 e F2.

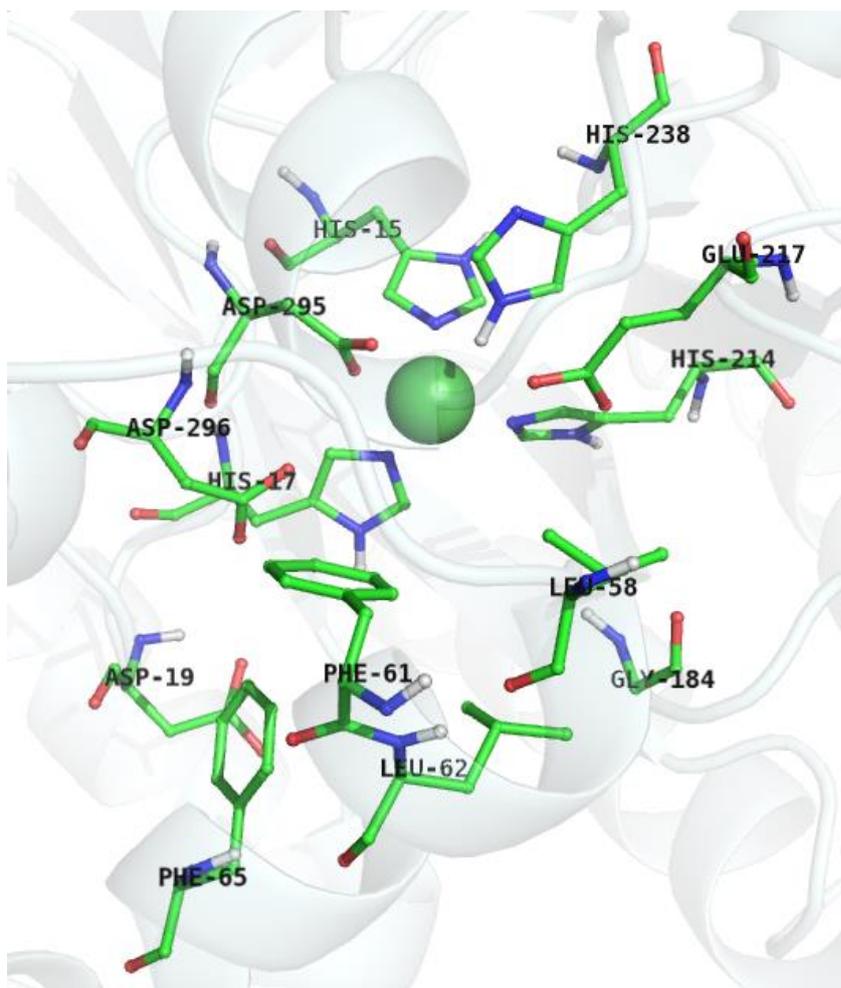


Figura 39 - Sítio ativo da ADA humana com os aminoácidos envolvidos nas interações produtivas para o efeito inibitório, observadas no presente trabalho.

4.3.4 Análise da relevância da pontuação

A variação da pontuação obtida nos ensaios de ancoramento molecular e a variação dos valores de K_i de cada um dos compostos analisados estão resumidos na Tabela 5. Foram analisados os valores das diferenças de pK_i e da pontuação bem como a relação entre eles. Quando um aumento de valor de pK_i era acompanhado por um aumento na pontuação, convencionou-se que a relação era direta, enquanto que quando um aumento de valor de pK_i

era acompanhado por uma diminuição na pontuação, convencionou-se que a relação era inversa.

Análise	/Δ pKi/	/Δ Pontuação/	Relação
1	2,06	2,36	Direta
2	3,05	3,66	Direta
3	2,08	1,34	Direta
4	3,04	12,45	Direta
5	2,24	4,67	Direta
6	2,10	6,69	Direta
7	2,02	7,97	Direta
8	2,72	3,32	Direta
9	2,62	3,33	Direta

Tabela 5 - Compostos e respectivos valores de pKi e módulo da diferença.

Observa-se que há uma uniformidade no comportamento da relação entre variação de pKi e variação de pontuação, ou seja, na maioria dos casos observados, um aumento no valor de pKi é acompanhado de um aumento no valor da pontuação.

Pode-se concluir então que a pontuação obtida dos estudos de modelagem de ligantes propostos, quando comparada dentro dos critérios pré-estabelecidos aqui, pode servir como uma previsão, ainda que qualitativa, da atividade dos compostos em estudo.

4.4 Desenho dos Ligantes

A proposição de novas estruturas combinou as informações conhecidas de relação estrutura-atividade inibitória da ADA bem como as observações dos estudos de modelagem molecular sobre as interações dos inibidores discutidos neste trabalho. A ideia principal desta etapa é desenhar estruturas de baixa complexidade, visando uma futura otimização para melhora do perfil inibitório. As estratégias de desenho estão listadas e comentadas abaixo:

- Estrutura não-nucleosídica: Entende-se por estrutura não-nucleosídica compostos que não contenham 2 anéis fundidos, que de alguma forma remetam à estrutura de um anel purínico, e que não contenham um substituinte oxolânico. Considerando os critérios de classificação dos compostos mostrados no presente trabalho, são os compostos que pertencem ao Grupo 1A. A justificativa para a escolha dessa estrutura reside no fato de que estes compostos possuem propriedades farmacocinéticas melhores quando comparadas com os

compostos contendo estrutura semelhante à de um anel purínico e/ou com um substituinte oxolânico, não sendo metabolizados tão rapidamente (TERASAKA et al.,2004).

- Presença de anel pirazólico: Todos os compostos conhecidos que não possuem anéis fundidos em sua estrutura, possuem uma estrutura imidazólica. Essa semelhança é compreensível uma vez que o anel imidazólico está compreendido no esqueleto da adenosina, substrato endógeno da ADA.

O anel pirazólico já foi testado como inibidor da ADA por Cristalli e colaboradores (1994). Especificamente, o artigo em questão realiza um estudo de relação estrutura-atividade (SAR) e conclui que a presença de um átomo de nitrogênio na posição 3 do anel azólico é fundamental para a atividade, e justifica sua afirmativa dizendo que os análogos pirazólicos tiveram resultados insatisfatórios.

Embora essa afirmativa possa desmotivar que futuros testes com análogos pirazólicos sejam realizados, foi observado que nenhum destes anéis pirazólicos possuía o grupo carboxamida como substituinte. Pela própria descrição de Cristalli e colaboradores (1994) pode-se observar que o grupo carboxamida é importante para a atividade: o composto imidazólico contendo o grupo carboxamida é 20 vezes mais potente que o seu análogo sem o referido grupo. Os estudos de modelagem molecular confirmam esses achados. A Figura 40 mostrou as interações realizadas pelo grupo carboxamida, responsáveis pelo menor valor de pK_i . É possível observar interações entre o hidrogênio do grupo carboxamida e a carboxila de Glu217 em distâncias de 2,1 e 2,8 Å, e entre o oxigênio do grupo carboxamida com o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (3,1 Å). Ao se planejar derivados pirazólicos com o grupo carboxamida, espera-se que o grupo carboxamida realize as mesmas interações observadas na Figura 40. Além disso, estima-se que o anel pirazólico também seja capaz de realizar interações com o hidrogênio do grupo amino de Gly184.

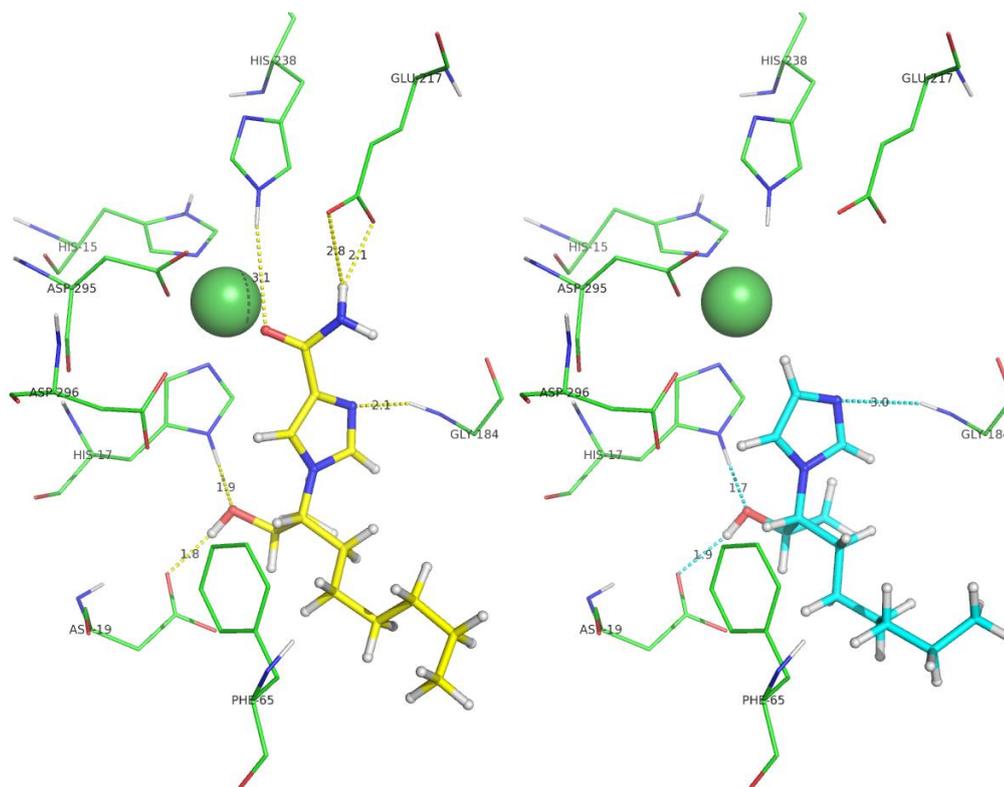


Figura 40 - Comparação entre o modo de interação teórico do composto 1-(2-hidroxi-3-nonila)-4-carboxamida-imidazol (amarelo) do composto 1-(2-hidroxi-3-nonila)-imidazol (ciano) com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas.

- Escolha dos substituintes: Os substituintes escolhidos foram cadeias alifáticas, contendo ou não anéis aromáticos. A cadeia alifática pode ser uma cadeia linear com 7 átomos de carbono, podendo ser substituída com uma hidroxila na posição 2. A cadeia alifática pode conter uma fenila não substituída espaçada por 1 a 2 metilenos do anel pirazólico.

Tais estruturas foram escolhidas em virtude dos dados de estudos já desenvolvidos. A cadeia alifática, opcionalmente hidroxilada, foi a estratégia utilizada no desenvolvimento do EHNA (**14**), um dos inibidores mais potentes da ADA (SCHAEFFER & VOGEL, 1965), por tirar vantagem de interações tanto hidrofóbicas, principalmente com Phe65, quanto hidrofílicas, com Asp19. A Figura 41 mostra o modo de interação do EHNA (**14**) na ADA bovina.

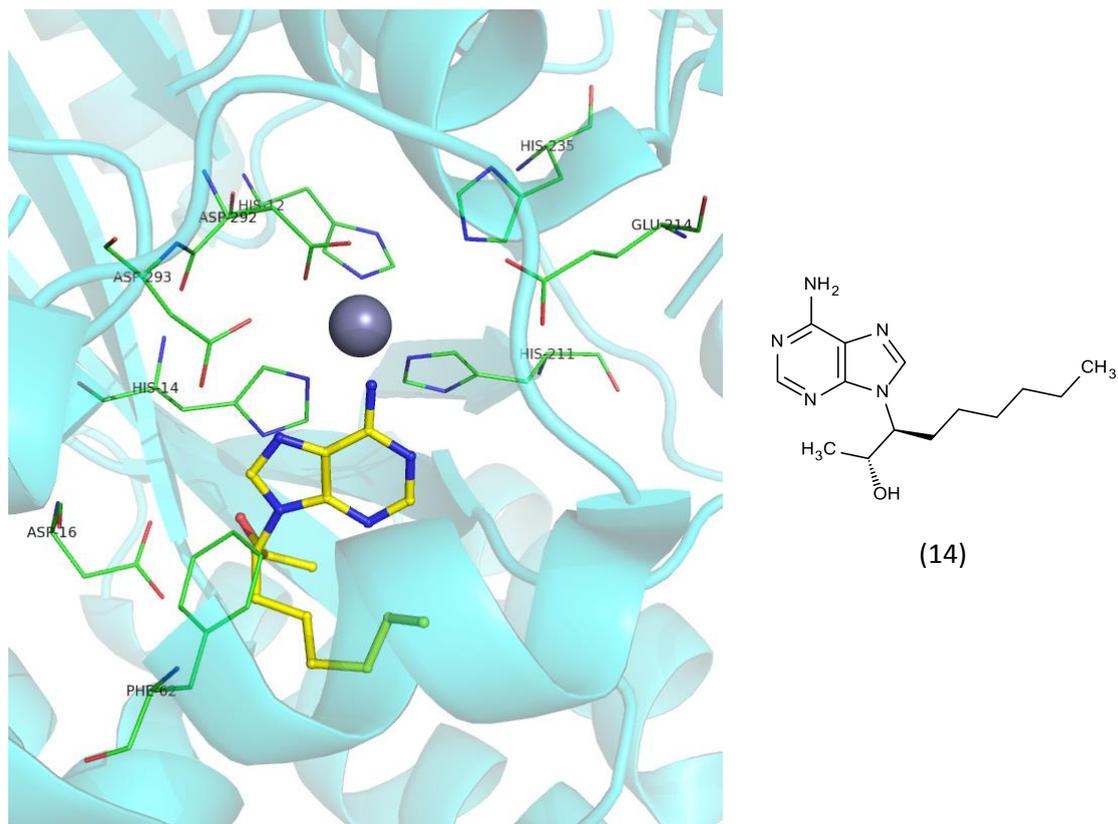


Figura 41 - Modo de interação do EHNA no sítio ativo da ADA bovina (COD PDB: 2Z7G), com os principais resíduos de aminoácidos em destaque e a estrutura do inibidor EHNA (14).

Além disso, o anel aromático serve como base para posterior inserção de outros substituintes ou fragmentos moleculares visando melhorar o perfil de inibição através da ampliação das interações com a ADA. A Figura 42 ilustra os 4 compostos propostos considerando as premissas aqui descritas.

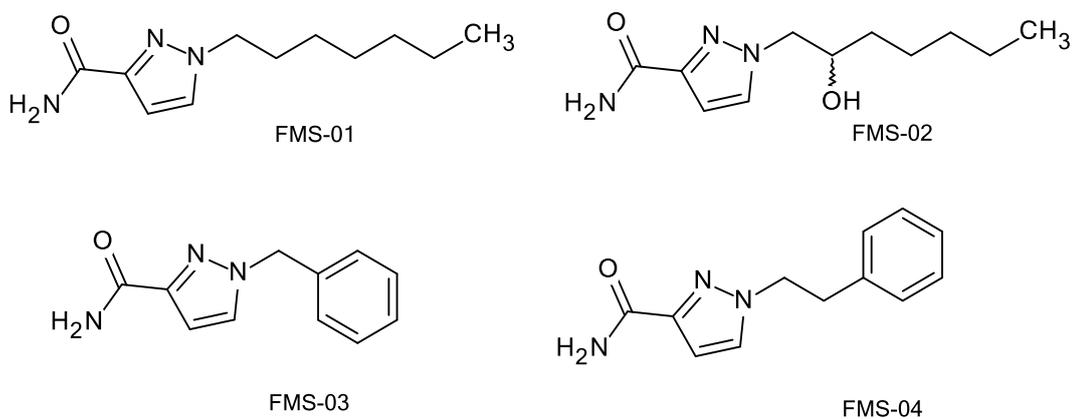


Figura 42 - Ligantes propostos para o presente estudo, todos com um anel pirazólico funcionalizado com o resíduo carboxamida e substituintes alquila, hidroxi-alquila, benzila e fenetila.

O intuito ao se desenhar tais compostos é que o modo de interação com o sítio ativo da enzima obedeça a algumas premissas, as quais são baseadas nas interações observadas:

- interações entre nitrogênio de anel heterocíclico e hidrogênio do grupo amino de Gly184;
- interações entre os hidrogênios do grupo amino da subunidade carboxamida e o carboxilato de Glu217, Asp295 e/ou Asp296;
- interações entre o oxigênio da subunidade carboxamida e o hidrogênio do nitrogênio imidazólico de His238;
- interações entre o hidrogênio da hidroxila e o carboxilato de Asp19;
- interações entre o oxigênio da hidroxila e o hidrogênio do nitrogênio imidazólico de His17.

Os ensaios de ancoramento molecular com os compostos FMS-01, FMS-02, FMS-03 e FMS-04 confirmaram a maioria das interações previstas. Detalhes do modo de interação de cada composto serão discutidos a seguir.

4.4.1 Ancoramento molecular de FMS-01

O composto FMS-01 apresenta uma estrutura pirazólica contendo o substituinte *n*-heptila na posição 1 e carboxamida na posição 3. A análise do ancoramento molecular de FMS-01 (Figura 43) mostrou que a cadeia alquílica de fato ficou alinhada com a fenila de Phe65. Pode-se observar ainda as interações favoráveis entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 (2,7 Å), entre o oxigênio da função carboxamida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (2,2 Å) e entre o hidrogênio da carboxamida com a carboxila de Glu217 (1,7 Å). O valor da pontuação obtido para o compostos FMS-01 foi de 63,20.

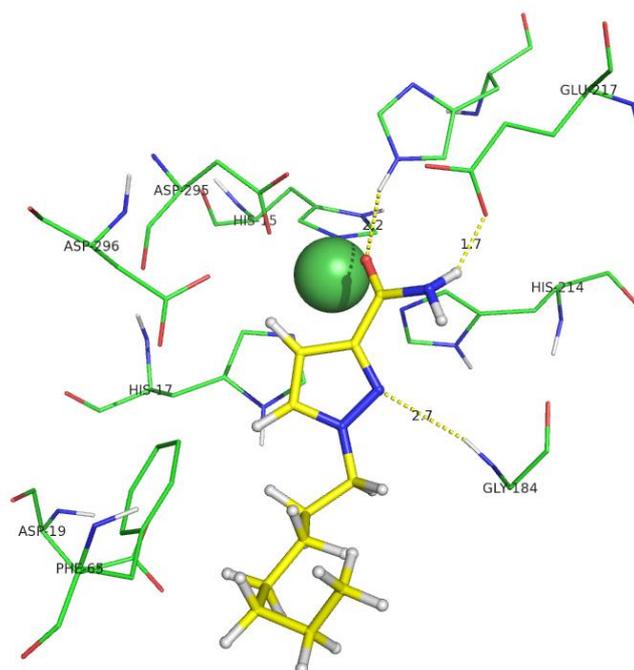


Figura 43 - Modo de interação teórico de FMS-01 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas.

4.4.2 Ancoramento molecular de FMS-02

O composto FMS-02 apresenta uma estrutura pirazólica contendo os substituintes 2-hidroxi-*n*-heptila, na posição 1 e carboxamida na posição 3, e por conta disso possui dois possíveis enantiômeros.

A análise do ancoramento molecular do antípoda *S* de FMS-02 (Figura 44) mostrou as interações favoráveis entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 (2,6 Å), entre o oxigênio da carboxamida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (2,7 Å), entre o hidrogênio da carboxamida com a carboxila de Glu217 (2,3 Å) e entre o hidrogênio da hidroxila com a carboxila de Asp19 (2,0 Å). O oxigênio da hidroxila não apresentou distância ou orientação adequadas para interação com o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His17. O valor da pontuação obtido para o composto FMS-02 (antípoda *S*) foi de 66,56.

A análise do ancoramento molecular do antípoda *R* de FMS-02 (Figura 44) mostrou as interações favoráveis entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 (2,8 Å), entre o oxigênio da carboxamida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (2,4 Å), entre o hidrogênio da carboxamida com a carboxila de Glu217 (2,1 Å) e entre o hidrogênio da hidroxila com a carboxila de Asp19 (2,2-2,7 Å). O oxigênio da hidroxila, embora próximo (2,0 Å), não apresentou orientação adequada para interação com o

hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His17. O valor da pontuação obtido para o composto FMS-02 (antípoda *R*) foi de 68,84.

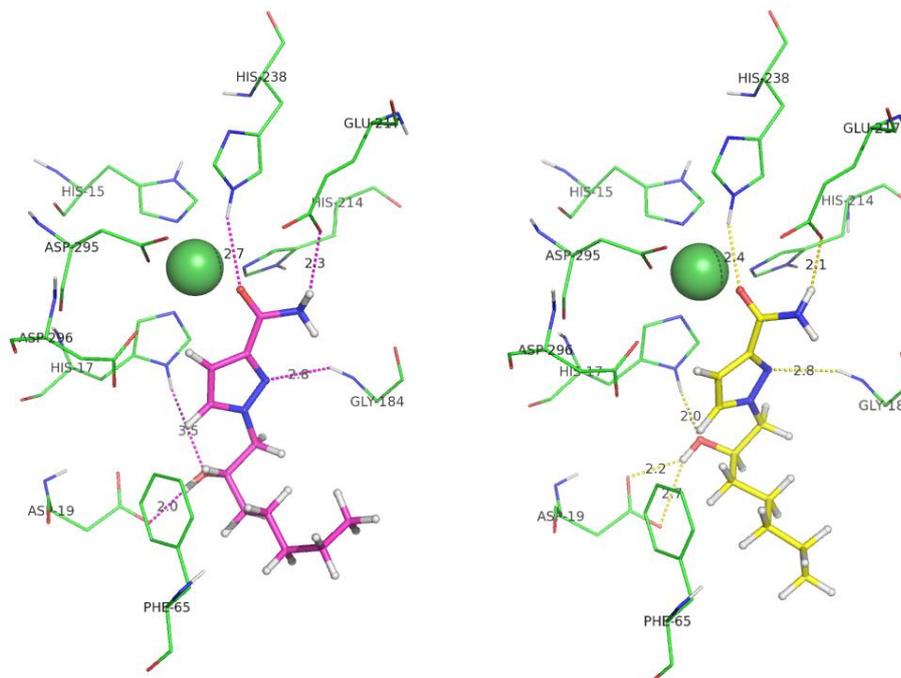


Figura 44 - Modo de interação teórico de FMS-02, antípoda *S* (magenta) e antípoda *R* (amarelo), com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas.

4.4.3 Ancoramento molecular de FMS-03

O composto FMS-03 apresenta uma estrutura pirazólica contendo os substituintes benzila na posição 1 e carboxamida na posição 3. A análise do ancoramento molecular de FMS-03 (Figura 45) mostrou que o anel aromático de fato ficou alinhado com a fenila de Phe65, formando interações de empacotamento π . Pode-se observar ainda as interações favoráveis entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 (2,8 Å) e entre o oxigênio da carboxamida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (2,9 Å). A interação entre o hidrogênio da carboxamida com a carboxila de Glu217 (2,7 Å) não possui uma orientação adequada. O valor da pontuação obtido para o composto FMS-03 foi de 60,28.

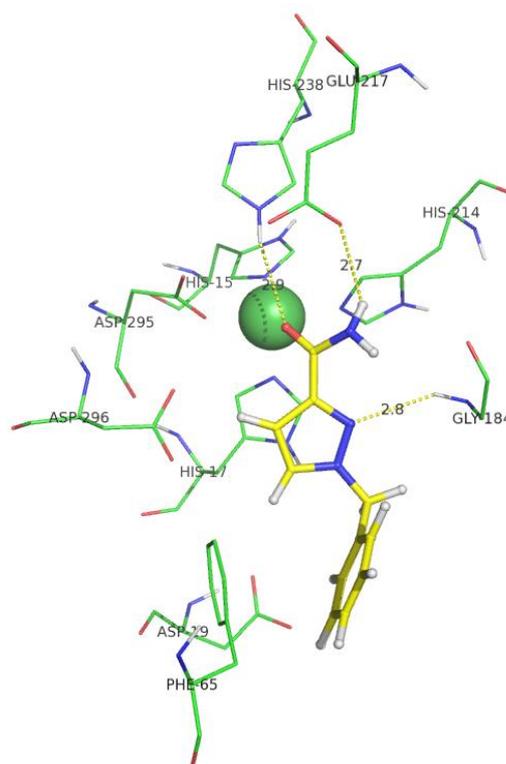


Figura 45 - Modo de interação teórico de FMS-03 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas.

4.4.4 Ancoramento molecular de FMS-04

O composto FMS-04 apresenta uma estrutura pirazólica contendo os substituintes 2-fenil-1-etila na posição 1 e carboxamida na posição 3. A análise do ancoramento molecular de FMS-04 (Figura 46) mostrou que o anel aromático de fato ficou alinhado com a fenila de Phe65, formando interações de empacotamento π . Pode-se observar ainda as interações favoráveis entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 (2,8 Å), entre o oxigênio da carboxamida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (2,3 Å) e entre o hidrogênio da subunidade carboxamida com a carboxila de Glu217 (2,0 Å). O valor da pontuação obtido para o composto FMS-03 foi de 68,30.

É possível observar que os compostos FMS-03 e FMS-04 obedecem aos critérios de semelhança utilizados no presente estudo uma vez que a diferença estrutural entre estes compostos é a inclusão de um metileno entre o anel pirazólico e a fenila, o qual tem o efeito de melhorar as distâncias interatômicas.

Pode-se observar que essa inclusão ocasionou uma melhora na pontuação de 8,02 unidades, sugerindo que o aumento do número de metilenos favorece a atividade do composto em estudo.

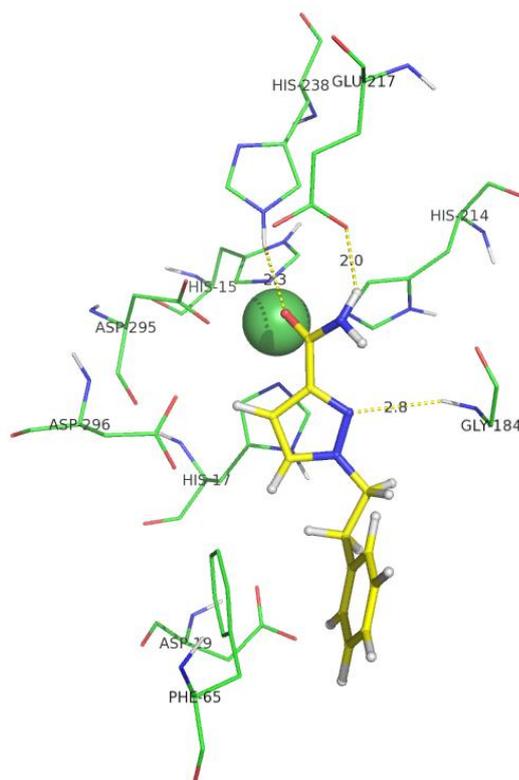


Figura 46 - Modo de interação teórico de FMS-04 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas.

Pode-se observar que em todos os compostos propostos algumas interações previstas foram confirmadas: houve interação entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184, entre o hidrogênio da carboxamida e a carboxila de Glu217, entre o oxigênio da carboxamida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238, entre o hidrogênio da hidroxila (presente somente em FMS-02) e a carboxila de Asp19 e as cadeias alquílicas e aromáticas realizaram interações hidrofóbicas com a fenila de Phe65.

Dos compostos propostos, nenhum deles foi adquirido ou sintetizado. Devido à disponibilidade comercial e similaridade estrutural ao composto proposto FMS-03, o ácido 1-benzil-5-metil-1*H*-pirazol-3-carboxílico (FMS-03.2) foi comprado e posteriormente funcionalizado à 1-benzil-5-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida (FMS-03.1). A diferença estrutural entre o composto proposto e os compostos testados reside na presença de uma metila ligada ao anel pirazólico (Figura 47).

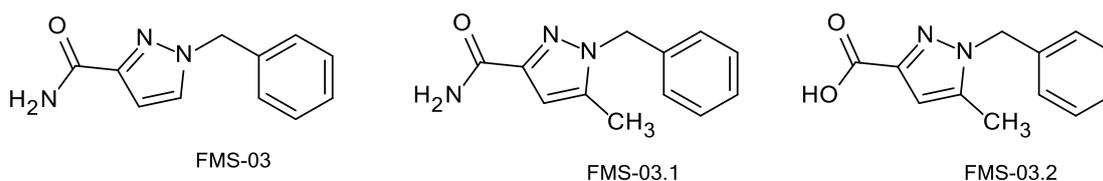


Figura 47 - Comparação entre o composto proposto (FMS-03) e os compostos testados (FMS-03.1 e FMS-03.2) para o presente estudo.

4.4.5 Ancoramento molecular de FMS-03.1

A análise do ancoramento molecular de FMS-03.1 (Figura 48) mostrou que o anel aromático de fato ficou alinhado com a fenila de Phe65, formando interações de empacotamento π . Além disso, a distância da metila à carboxila de Asp296 (2,4 Å) pode gerar uma repulsão estérica de FMS-03.1 no sítio ativo da ADA. Pode-se observar ainda as interações favoráveis entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 (2,7 Å) e entre o oxigênio da carboxamida e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (2,6 Å). A interação entre o hidrogênio da carboxamida com a carboxila de Glu217 (2,2 Å) não possui uma orientação adequada. O valor da pontuação obtido para o compostos FMS-03.1 foi de 60,03.

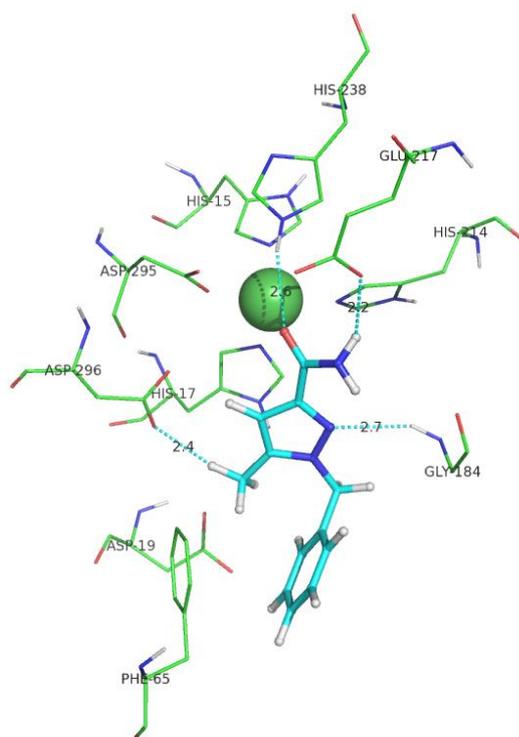


Figura 48 - Modo de interação teórico de FMS-03.1 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas.

4.4.6 Ancoramento molecular de FMS-03.2

A análise do ancoramento molecular de FMS-03.2 (Figura 49) mostrou que o anel aromático de fato ficou alinhado com a fenila de Phe65, formando interações de empacotamento π . Além disso, a distância da metila à carboxila de Asp296 (3,0 Å) pode gerar uma repulsão estérica de FMS-03.2 no sítio ativo da ADA. Pode-se observar ainda as interações favoráveis entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 (2,2 Å) e entre o oxigênio da carboxila e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238 (3,0 Å). O valor da pontuação obtido para o compostos FMS-03.1 foi de 59.57.

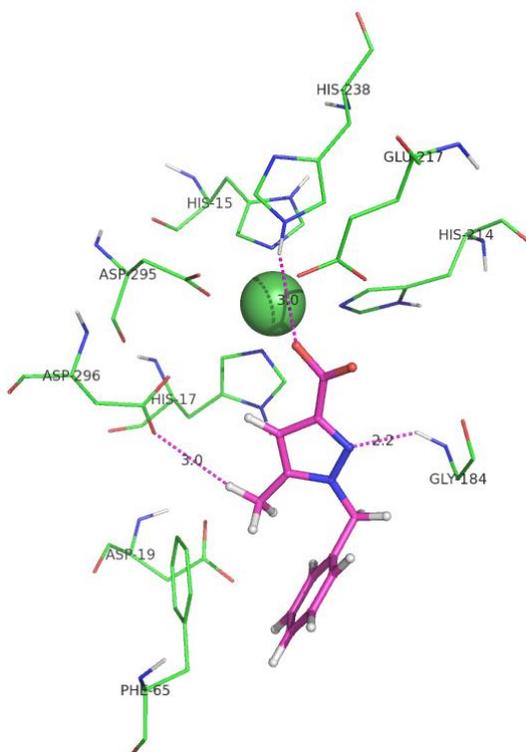


Figura 49 - Modo de interação teórico de FMS-03.2 com o sítio ativo da ADA humana. As respectivas distâncias interatômicas estão assinaladas.

Pode-se observar novamente que para os compostos FMS-03.1 e FMS03.2 algumas interações previstas foram confirmadas: houve interação entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184, entre o hidrogênio da carboxamida com a carboxila de Glu217, entre o oxigênio da carboxamida ou carboxila e o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel imidazólico de His238, e as cadeias aromáticas realizaram interações hidrofóbicas com a fenila de Phe65.

No que diz respeito à metila, muito já foi estudado a respeito de como uma simples modificação estrutural é capaz de afetar diferentes propriedades dos compostos bioativos (BARREIRO et al., 2011; LEUNG et al., 2012). No caso em questão, observa-se a proximidade com a carboxila de Asp196. As distâncias observadas entre a carboxila de Asp296 e a metila de FMS-03.1 (2,4 Å) e a metila de FMS-03.2 (3,0 Å) poderiam resultar em repulsões tanto de FMS-03.1 quanto de FMS-03.2 no sítio ativo da ADA.

A comparação das poses geradas pelos ensaios de ancoramento molecular dos três compostos (FMS-03, FMS-03.1 e FMS-03.2) revela uma concordância geral no perfil de interações (Figura 50). Pode-se observar que a distância entre o nitrogênio pirazólico e o hidrogênio do grupo amino de Gly184 para o composto FMS-03.2 foi a menor de todas. Uma possível explicação para isso é a ausência do grupo amino localizado próximo à carboxila de Glu217, que acarretaria uma mudança conformacional nos compostos dentro do sítio ativo por conta da possível interação entre as hidrogênios do grupo amino e a carboxila.

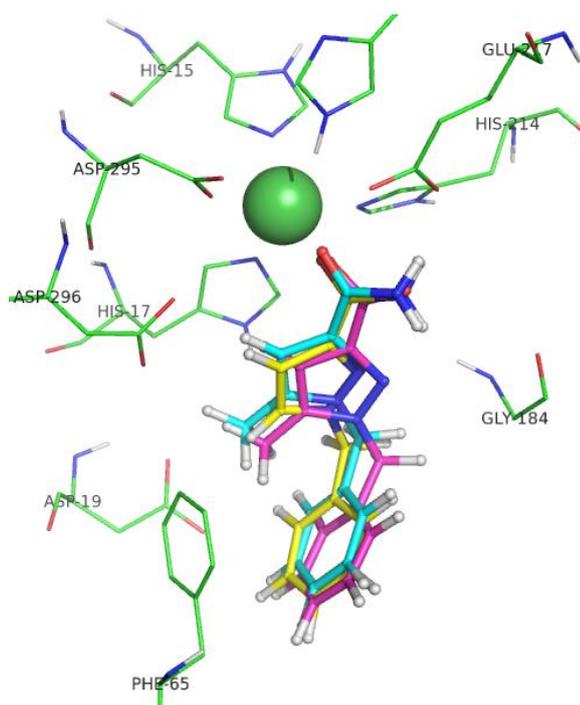


Figura 50 - Comparação das poses de FMS-03 (amarelo), FMS-03.1 (ciano) e FMS-03.2 (magenta) com o sítio ativo da ADA humana.

Comparando as estruturas de FMS-03 (pontuação 60,28), FMS-03.1 (pontuação 60,03) e FMS-03.2 (pontuação 59,57), pode-se perceber que, considerando os critérios de classificação estrutural mostrados aqui, todas se enquadram no grupo 1A e que se pode utilizar a pontuação dos ensaios de ancoramento molecular para que se tenha uma ideia do

comportamento de pK_i . Por apresentarem uma pontuação mais baixa, os compostos FMS-03.1 e FMS-03.2 seriam, em teoria, menos ativos que FMS-03.

4.5 Cinética Enzimática

Os ensaios de cinética enzimática foram realizados para aferir se os compostos adquiridos (FMS-03.1 e FMS-03.2) eram inibidores da ADA. Foi necessária a realização da cinética sem inibidor, para obtenção dos parâmetros da enzima, K_m e V_{max} , para que, em seguida, pudessem ser realizados os ensaios na presença dos inibidores. Utilizou-se o EHNA como inibidor de referência.

4.5.1 Obtenção de K_m e V_{max}

Para obtenção dos valores de K_m e V_{max} manteve-se a concentração de ADA constante à medida que a concentração de adenosina era aumentada. É necessário saturar a enzima para que a velocidade máxima seja atingida e, como os valores de K_m reportados para a ADA humana foram $52 \mu\text{M}$ (GAKIS, 1996), $50 \mu\text{M}$ (MEDIN et al., 1990) e $43 \mu\text{M}$ (HAKIMELAHY et al., 2001), perfazendo uma média de $48 \mu\text{M}$, utilizou-se uma concentração final de $150 \mu\text{M}$ de adenosina, aproximadamente 3 vezes maior que o valor de K_m médio.

A Figura 51 mostra a curva da cinética da ADA, na qual as concentrações de adenosina utilizadas foram 5, 10, 15, 25, 40, 50, 60, 75, 80, 100 e $150 \mu\text{M}$.

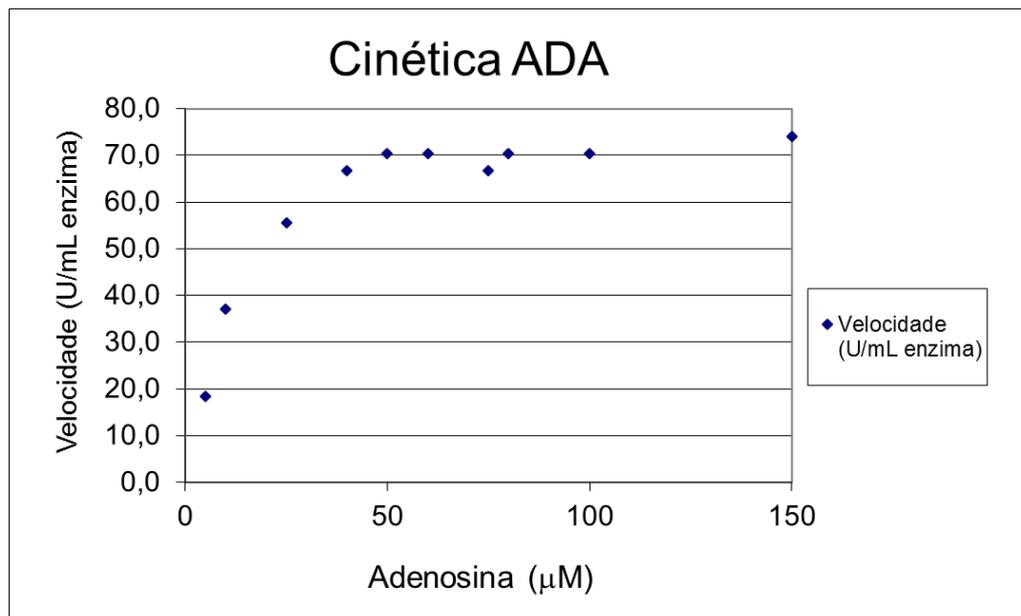


Figura 51 - Cinética da ADA com adenosina como substrato, mostrando as velocidades obtidas para as concentrações de 5, 10, 15, 25, 40, 50, 60, 75, 80, 100, 150 μM .

A Figura 52 mostra o gráfico de Linewaver-Burk (duplo recíproco), utilizado para a obtenção dos valores de K_m e V_{max} . A partir da equação obtida pela regressão linear dos pontos, foi possível obter os valores de K_m e V_{max} , a saber: $K_m = 18,73 \mu\text{M}$ e $V_{max} = 91,74 \text{ U/mL}$ de enzima. Observa-se que, considerando diferenças experimentais inerentes do método e do operador, e que a ordem de grandeza dos resultados é a mesma, o valor obtido encontra-se de acordo com os valores reportados por Gakis (1996), Medin e colaboradores (1990) e Hakimelahi e colaboradores (2001).

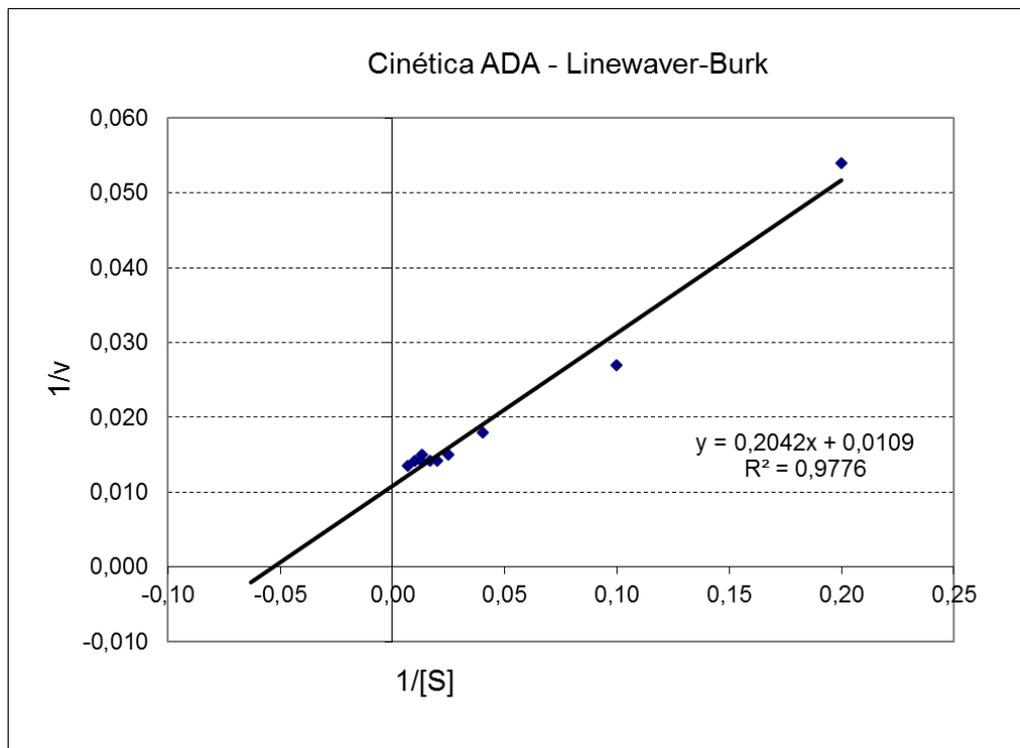


Figura 52 - Plotagem do duplo-recíproco a partir dos valores obtidos na cinética enzimática, para obtenção dos valores de K_m e V_{max} da ADA humana.

4.5.2 Ensaio de inibição

Uma vez conhecido o K_m da enzima, pode-se planejar um ensaio de inibição com a medição da velocidade da conversão de adenosina a inosina frente a diferentes concentrações de inibidor. A concentração de inibidor a ser utilizada deve ser pelo menos 10 vezes maior que o K_i do composto e a concentração do substrato não deve exceder o valor de K_m , para garantir assim um excesso de inibidor em relação ao substrato.

4.5.2.1 Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) (14)

O conhecido inibidor de ADA, (EHNA) (**14**), foi utilizado para garantir que a inibição da enzima pudesse ser observada através do método espectrofotométrico empregado. A literatura reporta valores de K_i entre 1,13-1,14 nM (PRAGNACHARYULU et al., 2000; DA SETTIMO et al., 2005; LA MOTTA et al., 2009). As concentrações de EHNA utilizadas foram 15, 25 e 40 nM.

A Figura 53 mostra a cinética de inibição da ADA na presença de EHNA. Observa-se o aumento do coeficiente angular das retas plotadas pelo duplo-recíproco a partir dos valores obtidos das cinéticas a medida que as concentrações de EHNA aumentam. Observa-se ainda que as retas se cruzam muito próximas ao eixo y, o que caracteriza uma inibição competitiva.

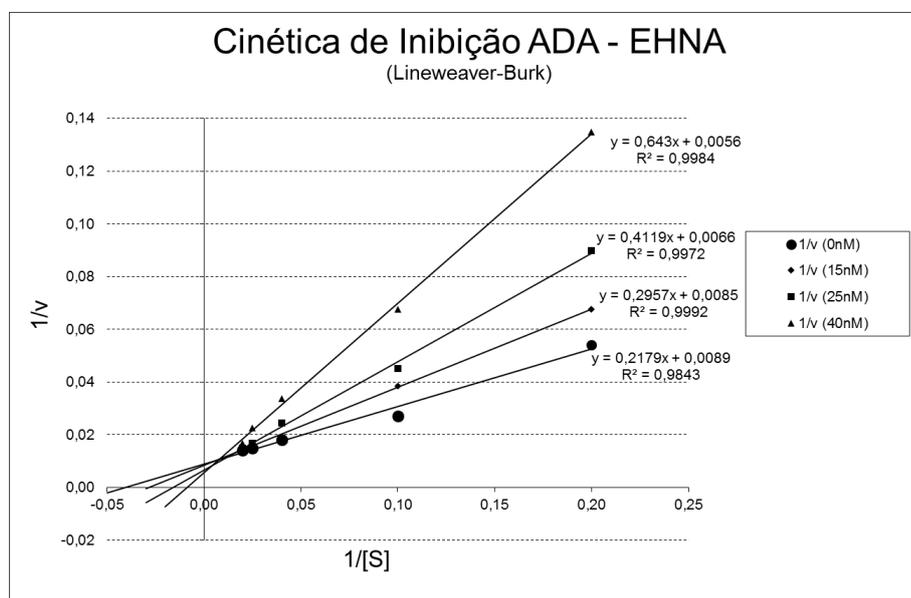


Figura 53 - Plotagem do duplo-recíproco da cinética de inibição da ADA com EHNA como inibidor nas concentrações de 0, 15, 25 e 40 nM, e respectivas regressões lineares.

A Figura 54 mostra a obtenção do valor de K_i a partir da extrapolação da regressão linear do gráfico do coeficiente angular, obtido a partir das regressões lineares da Figura 53, vs. concentração de EHNA. O K_i calculado a partir dos dados experimentais para o EHNA foi de 15,31 nM.

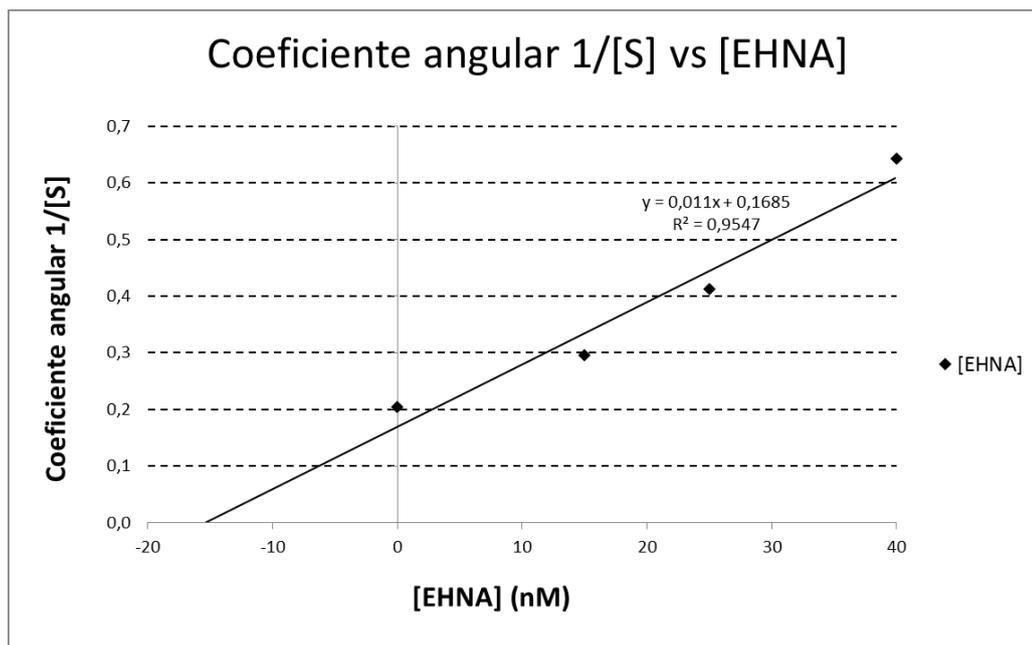


Figura 54 - Plotagem dos coeficientes angulares obtidos a partir da cinética de inibição da ADA com EHNA versus a concentração de EHNA utilizada.

4.5.2.2 FMS-03.1 e FMS-03.2

Uma vez que os valores de K_i para os compostos FMS-03.1 e FMS-03.2 são desconhecidos, foi necessário realizar inicialmente uma exploração com concentrações elevadas dos compostos, seguida de seu decréscimo, para que se tivesse uma ideia da faixa de seus valores de K_i .

A concentração inicial ensaiada para FMS-03.2 foi 100 μM , e, a despeito disso, nenhuma inibição da ADA foi observada.

O composto FMS-03.1 apresentou uma solubilidade em água menor quando comparado com FMS-03.2, e por isso foi ensaiado na concentração de 50 μM , a qual não foi capaz de resultar na inibição da ADA humana.

Esses resultados obtidos corroboram as previsões do modelo, que apontaram valores mais baixos de pontuação quando comparados com os valores de pontuação dos compostos FMS-02 e FMS-04. Fica assim clara a necessidade da síntese destes compostos originalmente planejados para avaliação no ensaio de inibição da ADA humana.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O modelo computacional aplicado foi capaz de reproduzir os dados experimentais e permitiu extrair informações acerca das principais interações envolvidas no reconhecimento molecular de inibidores conhecidos pela adenosina deaminase (ADA) humana.

Após a caracterização das subunidades farmacofóricas para a inibição da ADA humana, estas foram aplicadas no planejamento racional de novos ligantes estruturalmente simples e cujo potencial como inibidores de ADA foram confirmados por estudos de ancoramento molecular com a enzima alvo.

O modelo experimental mostrou-se capaz de monitorar a catálise e inibição da ADA.

Embora os resultados dos ensaios de ancoramento molecular sugeriram uma atividade menor para os compostos FMS-03.2, disponível comercialmente, e seu análogo FMS-03.1, quando comparado com FMS-03, proposto originalmente, tais compostos foram testados pela sua pronta acessibilidade. Os testes com os compostos comprovaram que os mesmos não são inibidores da ADA

Apontamos como perspectivas do presente trabalho a síntese dos compostos FMS-02 e FMS-04 propostos e a verificação de sua atividade inibitória na ADA humana *in vitro* e a validação de sua eficácia em modelos animais de doença.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, R. P., et al., Tight-binding inhibitors - IV. Inhibition of adenosine deaminases by various inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v.26, p.359-367, 1977.

AGARWAL, R.P., et al., Adenosine Deaminase from Human Erythrocytes: Purification and Effects of Adenosine Analogs. **Biochemical Pharmacology**, v.24, p.693-701, 1975.

AKKARI, R., et al., Recent Progress in the Development of Adenosine Receptor Ligands as Antiinflammatory Drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.6, p.1375-1399, 2006.

ALBRECHT, K., MUELLER-LADNER, U. Side effects and management of side effects of methotrexate in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.28, n.5, p.S95-S101, 2010.

ALDRICH, M. B., et al., The Importance of Adenosine Deaminase for Lymphocyte Development and Function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.272, p.311-315, 2000.

ALETAHA, D., et al. 2010 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria. **Arthritis & Rheumatism**, v.62, p.2569-2581, 2010.

ANDERSON, A. C., The Process of Structure-Based Drug Design. **Chemistry & Biology**, v.10, p.787-797, 2003.

ANTONINI, I., et al., Adenosine Deaminase Inhibitors. Synthesis of Deaza Analogues of erythro -9- (2-Hydroxy-3-nonyl)-adenine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.27, p.274-278, 1984.

ANTONIOLI, L. et al., Adenosine Deaminase in the Modulation of Immune System and its Potential as a Novel Target for Treatment of Inflammatory Disorders. **Current Drug Targets**, v.13, p.842-862, 2012.

ARNETT, F. C., et al., The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.31, p.315-324, 1988.

BARREIRO, E. J., et al., The Methylation Effect in Medicinal Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 111, p.5215-5246, 2011.

BISSANTZ, C., et al. A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.53, p.5061-5084, 2010.

BLACKBURN, M. R., KELLEMS, R. E., Adenosine Deaminase Deficiency: Metabolic Basis of Immune Deficiency and Pulmonary Inflammation. **Advances in Immunology**, v.86, p.1-41, 2005.

BONILLA-HERNÁN, M. G., et al., New drugs beyond biologics in rheumatoid arthritis: the kinase inhibitors. **Rheumatology**, v.50, p.1542-1550, 2011.

BRADY, T., Adenosine Deaminase, **Biochemical Journal**, v.36, p.478-484, 1942.

BRENNAN, F. M., McINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.118, p.3537-3545, 2008.

CAPELLINO, S. et al. Catecholamine-producing cells in the synovial tissue during arthritis: modulation of sympathetic neurotransmitters as new therapeutic target. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.69, p.1853-1860, 2010

CASCÃO, R., et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmunity Reviews**, v.9, p.531-535, 2010.

CAVASOTTO, C. N., PHATAK, S. S., Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today**, v.14, p.676-683, 2009.

CHAN, E. S. L., CRONSTEIN, B. N., Molecular action of methotrexate in inflammatory diseases. **Arthritis Research**, v.4, p.266-273, 2002.

CHAN, E. S. L., et al., Adenosine in inflammatory joint diseases. **Purinergic Signaling**, v.3, p.145-152, 2007.

CHAN, K. A., et al., The lag time between onset of symptoms and diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.37, p.814-820, 1994.

CHECHIK, B. E., et al. An immunomorphologic study of adenosine deaminase distribution in human thymus tissue, normal lymphocytes, and hematopoietic cell lines. **The Journal of Immunology**, v.126, p.1003-1007, 1981.

CHOY, E. H. S., PANAYI, G. S., Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v.344, p.907-916, 2001.

COLMEGNA, I., et al., Current Understanding of Rheumatoid Arthritis Therapy. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.91, p.607-620, 2012.

CONWAY, E. J., COOKE, R., LIX. The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. **Biochemical Journal**, v.33, p.479-492, 1939.

CORTÉS, A., et al. Moonlighting Adenosine Deaminase: A Target Protein for Drug Development. **Medicinal Research Reviews**, 2014. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21324/pdf>.

CRISTALLI, G., et al. Adenosine Deaminase Inhibitors: Synthesis and Structure-Activity Relationships of Imidazole Analogues of erythro-9-(2-Hydroxy-S-nonyl)-adenine. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.34, p.1187-1192, 1991.

CRISTALLI, G., et al. Adenosine Deaminase Inhibitors: Synthesis and Structure-Activity Relationships of 2-Hydroxy-3-nonyl Derivatives of Azoles. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p.201-205, 1994.

CRISTALLI, G., et al. Synthesis and Biological Evaluation of N⁶-Cycloalkyl Derivatives of 1-Deazaadenine Nucleosides: A New Class of Anti-Human Immunodeficiency Virus Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.38, p.4019-4025, 1995.

CRONSTEIN, B. N., Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. **Journal of Applied Physiology**, v.76, p.5-13, 1994.

CRONSTEIN, B. N., et al., Adenosine: a physiological modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. **The Journal of Experimental Medicine**, v.158, p.1160-1177, 1983.

CRONSTEIN, B. N., et al., Salicylates and sulfasalazine, but not glucocorticoids, inhibit leukocyte accumulation by an adenosine-dependent mechanism that is independent of inhibition of prostaglandin synthesis and p105 of NFκB. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.96, p.6377-6381, 1999.

CRONSTEIN, B. N., Low-Dose Methotrexate: A Mainstay in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Pharmacological Reviews**, v.57, p.163-172, 2005.

CURIS, M. A., et al., Adenosine deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of aralkyladenines (ARADS). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.8, p.1639-1642, 1998.

DA SETTIMO, F., et al., Novel, Highly Potent Adenosine Deaminase Inhibitors Containing the Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidine Ring System. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and Molecular Modeling Studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p.5162-5174, 2005.

DADDONA, P. E., et al., Human Adenosine Deaminase cDNA and complete primary amino acid sequence. **The Journal of Biological Chemistry**, v.259, p.12101-12106, 1984.

DONNELLY, P. et al. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v.447, p.661-78, 2007.

ELDRIDGE, M. D. et al. Empirical scoring functions:I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v.11, p.425-445, 1997.

ENGEL, P., et al., Therapeutic Targeting of B Cells for Rheumatic Autoimmune Diseases. **Pharmacological Reviews**, v.63, p.127-156, 2011.

FELDMANN, M., et al. Rheumatoid arthritis. **Cell**, v.85, p.307-310, 1996.

FELDMANN, M., MAINI, R. N., TNF defined as a therapeutic target for rheumatoid arthritis and other autoimmune disease. **Nature Medicine**, v.9, p.1245-1250, 2003.

FERREIRA, A. B. H. Aurélio século XXI: o dicionário da Língua Portuguesa. 3. ed. rev. e ampl. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.

FIRESTEIN, G. S., et al., Inhibition of neutrophil adhesion by adenosine and an adenosine kinase inhibitor. The role of selectins. **The Journal of Immunology**, v.154, p.326-334, 1995.

FORD, H. J., et al. Adenosine deaminase prefers a distinct sugar ring conformation for binding and catalysis: kinetic and structural studies. **Biochemistry**, v.39, p.2581-2592, 2000.

FRANCO, R., et al. Enzymatic and Extraenzymatic Role of Adenosine Deaminase 1 in T-Cell-Dendritic Cell Contacts and in Alterations of the Immune Function. **Critical Reviews in Immunology**, v.27, p.495-509, 2007.

FRIESNER, R. A. *Ab initio* quantum chemistry: Methodology and applications; **Proceedings of the National Academy of Science**, v.102, p.6648-6653, 2005.

FUJIMOTO, M., et al., Interleukin-6 Blockade Suppresses Autoimmune Arthritis in Mice by the Inhibition of Inflammatory Th17 Responses. **Arthritis & Rheumatism**, v.58, p.3710-3719, 2008.

GAKIS, C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: diagnostic and biological role. **European Respiratory Journal**, v.9, p.632-633, 1996.

GILLERMAN, I., FISCHER, B. Investigations into the Origin of the Molecular Recognition of Several Adenosine Deaminase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, p.107-121, 2011.

GOEKOOP-RUITERMAN, Y. P. M., et al. Clinical and Radiographic Outcomes of Four Different Treatment Strategies in Patients With Early Rheumatoid Arthritis (the BeSt Study). **Arthritis & Rheumatism**, v.52, p.3381-3390, 2005.

GOHLKE, H., KLEBE, G. Approaches to the Description and Prediction of the Binding Affinity of Small-Molecule Ligands to Macromolecular Receptors. **Angewandte Chemie International Edition**, v.41, p.2644-2676, 2002

GOODMAN, T. A., POLISSON R. P. Methotrexate: adverse reactions and major toxicities. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.20, p.513-528, 1994

GREGERSEN, P. K. et al. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. v.30, p.1205-1213, 1987

HAKIMELAHI, G. H., et al. Synthesis and Biological Evaluation of Purine-Containing Butenolides. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p.1749-1757, 2001.

HARINGMAN, J. J., et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.64, p.834-838, 2005.

HARRIMAN, G. C. B., ABUSHANAB, E., Adenosine Deaminase Inhibitors. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Amino-1-(2(S)-hydroxy-3(R)-nonyl)- 1*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridine (3-Deaza-(+)-EHNA) and Certain C1' Derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.37, p.305-308, 1994.

HARRIS, D. E., Rheumatoid Arthritis — Pathophysiology and Implications for Therapy. **The New England Journal of Medicine**, v.322, p.1277-1289, 1990.

HASKÓ, G., et al., Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. **The Journal of Immunology**, v.157, p.4634-4640, 1996.

HOLERS, V. M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Immunology**, v.25, p.728–735, 2013.

HÖLTJE, H., et al., Molecular Modelling: Basic Principles and Applications. Wiley-VCH, 3ª edição, 2008.

IWAKI-EGAWA, S., et al. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biological Chemistry**, v.387, p.319-321, 2006.

JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v.267, p.727-748, 1997.

KELLY, M. A., et al., Primary structure of bovine adenosine deaminase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, p.1513-1519, 1996.

KLARESKOG, L., et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: Smoking may trigger HLA–DR (shared epitope)–restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis & Rheumatism**. v.54, p.38-46, 2006.

KLARESKOG, L., et al., Rheumatoid Arthritis. **Lancet**, v.373, p.659-672, 2009.

KORB, O.; et al. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.49, p.84-86, 2009.

KREMER, J. M., et al., Treatment of Rheumatoid Arthritis by Selective Inhibition of T-Cell Activation with Fusion Protein CTLA4Ig. **The New England Journal of Medicine**, v.349, p.1907-1915, 2003.

LA MOTTA, C., et al. Exploiting the Pyrazolo[3,4-*d*]pyrimidin-4-one Ring System as a Useful Template To Obtain Potent Adenosine Deaminase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.52, p.1681-1692, 2009.

LAI, T. F., MARSH, R. E. The Crystal Structure of Adenosine. **Acta Crystallographica Section B**, v.28, p.1982-1989, 1972.

LEUNG, C. S., et al., Methyl Effects on Protein–Ligand Binding. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.55, p.4489-4500, 2012.

LIEW, F. Y., McINNES, I. B. The role of innate mediators in inflammatory response. **Molecular Immunology**, v.38, p.887-890, 2001.

MA, X.; XU, S. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis (Review). **Biomedical Reports**, v.1, n.2, p.177-184; 2013.

McGONALE, D., et al., Microanatomic Studies to Define Predictive Factors for the Topography of Periarticular Erosion Formation in Inflammatory Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. v.60, p.1042-1051, 2009.

McINNES, I. B., SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, v.7, p.429-442, 2007.

McINNES, I. B., SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v.365; n.23, p.2205-2219, 2011.

MEDIN, J. A., et al., Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.87, p.2760-2764, 1990.

MITCHELL, D. M., FRIES, J. M. An analysis of the american rheumatism association criteria for rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.25, p.481-487, 1982.

MOOJI, W. T.; VERDONK, M. L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**. V.61, p.272-287, 2005.

MURAOKA, T., et al., Automated Enzymatic Measurement of Adenosine Deaminase Isoenzyme Activities in Serum. **Analytical Biochemistry**, v.187, p.268-272, 1990.

MURPHY, J., et al. A critical reexamination of the continuous spectrophotometric assay for adenosine deaminase. **Analytical Biochemistry**, v.122, p.328-337, 1982.

NADKARNI, S., et al., Anti-TNF- α therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- β . **The Journal of Experimental Medicine**, v.204, p.33-39, 2007.

NAIR, V., WIECHERT, R. J., Substrate Specificity of Adenosine Deaminase-Function of the 5'-Hydroxyl Group of Adenosine. **Bioorganic Chemistry**, v.9, p.423-433, 1980.

NEOGI, T., et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Classification Criteria for Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.62, p.2582-2591, 2010.

NIITSU, N., et al., Human monocytoid leukemia cells are highly sensitive to apoptosis induced by 2'-deoxycoformycin and 2'-deoxyadenosine: association with dATP-dependent activation of caspase-3. **Blood**, v.92, p.3368-3375, 1998.

NIU, W., et al, The Role of Zn²⁺ on the Structure and Stability of Murine Adenosine Deaminase. **The Journal of Physical Chemistry B**, v.114, p.16156-16165, 2010.

OHSHIMA, S., et al., Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.95, p.8222-8226, 1998.

OLSSON, T. S. G., et al. The Thermodynamics of Protein-Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. **Journal of Molecular Biology**, v.384, p.1002-1017, 2008.

PANTHER, E., et al., Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. **Blood**, v.101, p.3985-3990, 2003.

PENSAK, D. A. Molecular modelling: scientific and technological boundaries. **Pure and Applied Chemistry**, v.61, p.601-603, 1989.

PRAGNACHARYULU, P. V. P., et al., Adenosine Deaminase Inhibitors: Synthesis and Biological Evaluation of Unsaturated, Aromatic, and Oxo Derivatives of (+)-erythro-9-(2'-S-Hydroxy-3'-R-nonyl)adenine [(+)-EHNA]. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.43, p.4694-4700, 2000.

RATECH H., et al., Comparison and possible homology of isozymes of adenosine deaminase in Aves and humans. **Enzyme**, v.26, p.74-84, 1981.

RATECH, H., HIRSCHHORN, R. Serum adenosine deaminase in normals and in a patient with adenosine deaminase deficient-severe combined immunodeficiency. **Clinical Chimica Acta**, v.115, p.341-347, 1981.

RAZA, K., et al. Early rheumatoid arthritis is characterized by a distinct and transient synovial fluid cytokine profile of T cell and stromal cell origin. **Arthritis Research & Therapy**, v.7, R784-R795, 2005.

RHEE, D. K., et al. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. **The Journal of Clinical Investigation**, v.115, p.622-631, 2005.

ROSE, H. M., et al., Differential Agglutination of Normal and Sensitized Sheep Erythrocytes by Sera of Patients with Rheumatoid Arthritis. **Experimental Biology and Medicine**, v.68, p.1-6, 1948

SABEH, F., et al., Membrane-Type I Matrix Metalloproteinase-Dependent Regulation of Rheumatoid Arthritis Synoviocyte Function. **The Journal of Immunology**, v.184, p.6396-6406, 2010.

SABOURY, A. A., et al., A Product Inhibition Study on Adenosine Deaminase by Spectroscopy and Calorimetry. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v.35, p.302-305, 2002.

SANT'ANNA, C. M. R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**, v.1, p.49-57, 2009.

SATTAR, N., McINNES, I. B., Vascular comorbidity in rheumatoid arthritis: potential mechanisms and solutions. **Current Opinion in Rheumatology**, v.17, p.286-292, 2005.

SCHAEFFER, H. J., VOGEL, D. Enzyme Inhibitors. IX. Hydrophobic Interactions of Some 9-Alkyladenines with Adenosine Deaminase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.8, p.507-509, 1965.

SCHER, J. U., et al; Characteristic Oral and Intestinal Microbiota in Rheumatoid Arthritis (RA): A Trigger for Autoimmunity? **Arthritis & Rheumatism**, v.62, Suppl 10, 2010.

SENNA, E. R. et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. **The Journal of Rheumatology**, v.31, n.3, p.594-597, 2004.

SHARFF, A. J., et al., Refined 2.5 Å Structure of Murine Adenosine Deaminase at pH 6.0. **Journal of Molecular Biology**, v.226, p.917-921, 1992.

SHOWALTER, H. D. H., et al., Adenosine Deaminase Inhibitors. Synthesis and Biological Evaluation of (±)-3,6,7,8-Tetrahydro-3-[(2-hydroxyethoxy)methyl]imidazo [4,5-*d*][1,3]diazepin-8-ol and Some Selected C-5 Homologues of Pentostatin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.26, p.1478-1482, 1983.

SHU, Q., FRIEDEN, C., Relation of Enzyme Activity to Local/Global Stability of Murine Adenosine Deaminase: ¹⁹F NMR Studies. **Journal of Molecular Biology**, v.354, p.599-610, 2005.

SINGH, P., et al., Aza analogues of nucleic acid constituents II. Crystal structures of 8-azadaminopurine sulphate monohydrate and 8-azahypoxanthine dihydrate. **Journal of Crystal and Molecular Structure**, v.4, p.263-268, 1974.

SMITTEN, A. L., et al., A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.10, n.2, R45, 2008.

SMOLEN, J. S., EMERY, P. Infliximab: 12 years of experience. **Arthritis Research & Therapy**, v.13(Suppl.1), S2, 2011.

SOLOMON, D. H., et al., Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. **Circulation**, v.107, p.1303-1307, 2003.

SYMMONS, D. P. M., et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis. Results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. **Arthritis & Rheumatism**. v.40, p.1955-1961, 1997.

TAKAYOSHI K., et al. Structural Basis of Compound Recognition by Adenosine Deaminase. **Biochemistry**, v.44, p.10562-10569, 2005.

TAYLOR, P. C. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, v.10, p.308-315, 2010.

TERASAKA, T. et al., Structure-Based De Novo Design of Non-nucleoside Adenosine Deaminase Inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p.1115-1118, 2003.

TERASAKA, T., et al. Rational Design of Non-Nucleoside, Potent, and Orally Bioavailable Adenosine Deaminase Inhibitors: Predicting Enzyme Conformational Change and Metabolism. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.48, p.4750-4753, 2005.

TERASAKA, T., et al. Structure-Based Design and Synthesis of Non-Nucleoside, Potent, and Orally Bioavailable Adenosine Deaminase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p.2728-2731, 2004.

TERASAKA, T., et al. Structure-Based Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies of Novel Non-nucleoside Adenosine Deaminase Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.47, p.3730-3743, 2004.

TERASAKA, T., et al., A Highly Potent Non-Nucleoside Adenosine Deaminase Inhibitor: Efficient Drug Discovery by Intentional Lead Hybridization. **Journal of the American Chemical Society**, v.126, p.34-35, 2004.

VAN DER HEIDE, A. et al. The Effectiveness of Early Treatment with "Second-Line" Antirheumatic Drugs: A Randomized, Controlled Trial. **Annals of Internal Medicine**, v.124, p.699-707, 1996.

VAN DER WEYDEN, M. B., KELLEY, W. N. Adenosine deaminase and immune function. **British Journal of Haematology**, v.34, p.159-165, 1976.

VAN DONGEN, H., et al. Efficacy of Methotrexate Treatment in Patients With Probable Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v.56, p.1424-1432, 2007.

VERLI, H., BARREIRO, E. J., Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Química Nova**, v.28, p.95-102, 2005.

VISSER, H., et al., How to Diagnose Rheumatoid Arthritis Early. **Arthritis & Rheumatism**. v.46, p.357-365, 2002.

WEGNER, N., et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and α -enolase: Implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**. v.62, p.2662-2672, 2010.

WESSELS, J. A. M., et al. Recent insights in the pharmacological actions of methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v.47, p.249-255, 2008.

WEYAND, C. M., GORONZY, J. J., T-cell-targeted therapies in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.2, p.201-210, 2006.

WILSON, D. K., et al. Atomic Structure of Adenosine Deaminase Complexed with a Transition-State Analog: Understanding Catalysis and Immunodeficiency Mutations. **Science**, v.252, p.1278-1284, 1991.

WU, X., et al. A Theoretical Study on the Catalytic Mechanism of Mus musculus Adenosine Deaminase. **Journal of Computational Chemistry**, v.31, p.2238-2247, 2010.

ZAKERI, Z., et al., Comparison of adenosine deaminase levels in serum and synovial fluid between patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v.5, n.2, p.195-200, 2012.

ZAVIALOV, A. V., ENGSTRÖM, Å., Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. **Biochemical Journal**, v.391, p.51-57, 2005.

ZAVIALOV, A. V., et al. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 88, p.279-290, 2010.

ZAVIALOV, A. V., et al., Structural Basis for the Growth Factor Activity of Human Adenosine Deaminase ADA2. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.12367-12377, 2010.

ZHENG, H., et al., Data mining of metal ion environments present in protein structures. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.102, p.1765-1776, 2008.