



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **BR 102017007449-8 A2**

(22) **Data do Depósito:** 11/04/2017

(43) **Data da Publicação:** 30/10/2018



(54) Título: UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES

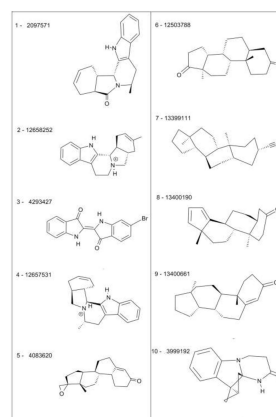
(51) Int. Cl.: C07D 455/02; C07D 403/02; C07C 49/603; A61P 31/10

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

(72) Inventor(es): MARISTELA PEREIRA;
ROOSEVELT ALVES DA SILVA; CECÍLIA MARIA ALVES DE OLIVEIRA; LUCILIA KATO; CÉLIA MARIA DE ALMEIDA SOARES; FAUSTO GUIMARÃES COSTA; CARLA DOS SANTOS FREITAS; BENEDITO RODRIGUES DA SILVA NETO; RICARDO LEMES GONÇALVES; MARIA JOSÉ SOARES MENDES GIANNINI; JULHIANY DE FÁTIMA DA SILVA

(85) Data do Início da Fase Nacional:
11/04/2017

(57) Resumo: A patente de invenção se refere à descoberta de novos compostos como potenciais candidatos a protótipos de fármacos. Neste contexto, apresentamos 20 compostos selecionados do banco ZINC, os quais apresentaram significativa complementaridade estérica com o sítio catalítico de PbMLS, conformação energeticamente favoráveis, o que contribuiu para uma alta afinidade e especificidade destas entidades químicas que tiveram as melhores funções de pontuação. Além disto, destaca-se que estas moléculas estabelecerem contatos com aminoácido de PbMLS semelhantes aos encontrados na interação de PbMLS e seu substrato natural, acetil-CoA. Também referimos à quatro alcaloides como potenciais candidatos a protótipos de fármacos, uma vez que estes apresentaram ação inibitória sobre o crescimento de espécies de Paracoccidioides sp, inibiram a atividade da PbMLSr e aderência do fungo e da PbMLSr aos componentes da matriz extracelular e à células A549 e MRC5. Assim, esta nova descoberta tem como objetivo o desenvolvimento de antifúngicos inovadores e mais específicos, com mecanismo de ação eficiente e que limite os efeitos tóxicos decorrente de seus uso a(...)



UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção trata da indicação de alcaloides e compostos naturais a protótipos de fármacos, visando sua aplicação como antifúngicos. Assim, com base nos estudos realizados foram possíveis as seleções de compostos capazes de inibir o crescimento de espécie de *Paracoccidioides* sp. Para isto, utilizou-se, primeiramente, ferramentas *in silico*, as quais selecionaram por triagem virtual 20 compostos candidatos a inibir *PbMLS*. Baseado nestas estruturas, nove alcalóides foram selecionados em nosso laboratório. Os mecanismos primários das interações na bolsa de ligação de *PbMLS* foram identificados e comparados com os de acetil-CoA, substrato da *PbMLS*. Além disso, os teste *in vitro* mostraram que quatro compostos alcalóides β -carbolina foram capazes de inibir a atividade da *PbMLS* recombinantes (*PbMLSr*), o crescimento de espécie de *Paracoccidioides* sp, e aderência do fungo e da *PbMLSr* aos componentes da matriz extracelular. A citotoxicidade dos alcalóides também foi avaliada. Para isto, testes como a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos, ensaios de adesão e microscopia de fluorescência, ensaios enzimáticos e avaliação da citotoxicidade foram avaliados.

BACKGROUND DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA

[002] A Paracoccidioidomicose (PCM), doença causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb*), está entre as principais infecções micóticas clássicas que acometem os seres humanos no Brasil e é apontada, segundo o estudo de Prado *et al* (2009) como responsável por mais da metade das micoses sistêmicas relatadas no período entre 1996-2006 no território brasileiro. Endêmica na América latina, a PCM está presente em outros países além do Brasil, principalmente na Argentina, Colômbia e Venezuela. Seu agente etiológico encontra-se na forma de micélio quando em condições saprófitas e leveduriforme quando nos tecido do hospedeiro. Na natureza, a estrutura miceliana corresponde a filamentos septados, com presença de propágulos infectantes denominados conídios. A inalação destes conídios representa a forma de contágio humano mais aceito. Apesar de estar presente em macacos, tatus e até mesmo em cães urbanos, a possibilidade de transmissão do *P. brasiliensis* de animais para o homem não

foi verificada (ALMEIDA, 1929 apud BENCHIMOL & SÁ, 2004; BAGAGLI *et al*, 1998; BAGAGLI *et al*, 2006; CORTE *et al*, 2007; CORTE *et al*, 2012; LACAZ, 1994 apud MARCOS, 2011; SILVA *et al*, 1994).

[003] Dos casos notificados de PCM, o Brasil representa cerca de 80%, com destaque para as regiões sul, sudeste e centro-oeste. A região centro-oeste, em um estudo realizado por Coutinho *et al* (2002), que descrevem a taxa de mortalidade da PCM no Brasil, no período de 1980 a 1995, foi apontada como detentora do segundo maior coeficiente do País e com tendência a ascensão. Além disso, a abertura de novas fronteiras agrícolas e derrubadas de florestas nesta região podem contribuir para o surgimento de novos casos de PCM (COUTINHO *et al*, 2002; MARQUES 2003; SAN-BLAS, *et al*, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006).

[004] A PCM prevalece em indivíduos fumantes e etilistas crônicos. Santos *et al* (2003) verificaram que a chance de adoecer foi 14 vezes maior entre os fumantes e que quando fumavam 20 ou mais cigarros dia, adoeciam em média oito anos antes dos demais. Indivíduos que bebiam acima de 50g/dia de álcool, apresentaram chances de 3,6 vezes maiores de adoecerem.

[005] A presença desta micose em pessoas portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH – em inglês: human immunodeficiency vírus - HIV) também merece especial atenção devido à sua elevada mortalidade, que chega a 30%, o que é maior que os casos de PCM não associados ao HIV (MARQUES, 1993 apud MARQUES, 2003; MARQUES, 2003; MARQUES, 2009; RAMOS-E-SILVA & SARAIVA, 2008).

[006] Com relação à presença do fator ocupacional, acredita-se que devido o solo ser possivelmente o habitat natural do fungo, os trabalhadores rurais sejam preferencialmente acometidos pela PMC, uma vez que há o favorecimento do contato direto destes com a terra. Desta forma, especula-se que esta atividade constitua em fator predisponente para aquisição da moléstia, que também prevalece em indivíduos com baixo nível sócio-econômico (RAMOS-E-SILVA & SARAIVA, 2008; SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006).

[007] Todavia, apesar de ser a oitava causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias, afetar indivíduos em sua fase mais produtiva, diminuir a

qualidade e tempo de vida, e se destacar como um sério problema de saúde pública, a PCM é uma enfermidade negligenciada. Assim, ela faz parte de um grupo de doenças que não é alvo de pesquisas das grandes empresas multinacionais farmacêuticas e recebe poucos fomentos por parte das instituições envolvidas com políticas de saúde pública. Em parte, isto pode ser explicado pelo fato da PCM ser uma doença que afeta populações de baixa renda, mercado este pouco promissor para o ganho de capital, visto ser carente de potenciais compradores de medicamentos (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010; COUTINHO *et al*, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; SAN-BLAS *et al*, 2002; SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006).

[008] Quanto às características da doença, a PCM pode se manifestar de forma aguda/sub-aguda ou crônica, esta subdividida em unifocal ou multifocal, e forma residual ou sequelar. A forma aguda/sub-aguda, também conhecida como juvenil, afeta predominantemente crianças e adolescentes, representa de 3 a 5% dos casos da doença e tem gravidade moderada a grave. A forma crônica responde por mais de 90% dos casos e predomina em indivíduos do gênero masculino com idade entre 30 a 60 anos. A evolução da doença é lenta e pode levar até décadas para o diagnóstico. Quando apenas um órgão ou sistema é acometido, temos o estado unifocal, pulmão é afetado em 25% dos casos. O tipo multifocal está relacionado com o envolvimento de mais de um órgão, sendo os sítios mais acometidos os pulmões, mucosa e pele. Caso a doença evolua para “cura”, as cicatrizes podem provocar sequelas e apresentar fungos viáveis, o que justificaria o reaparecimento da doença. Há também situações em que nenhuma manifestação da doença é verificada em indivíduos infectados pelo *P. brasiliensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; MENDES, 1994 apud ARANTES, 2012; SYLVESTRE *et al*, 2014; SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006).

[009] Contudo, quando presente a enfermidade, a terapia medicamentosa que deve ser realizada, envolve principalmente fármacos pertencentes às classes das sulfonamidas, polienos e azóis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; SHIKANAI-YASUDA *et al*, 2006).

[010] Todavia, apesar da utilização destas classes de fármacos, a terapia medicamentosa antifúngica persiste como sério problema, pois além da toxicidade de determinados fármacos e aos longos períodos de tratamento, existe a resistência aos

antifúngicos, fato este que se encontra em crescente evolução e complica a gestão do paciente acometido por micoses (ELLIS 2002; PFALLER, 2012; SYLVESTRE *et al*, 2014). Assim, pesquisas que objetivam o desenvolvimento de drogas antifúngicas inovadoras são necessárias. Para isto, um dos caminhos é através da exploração de diferenças bioquímicas entre o patógeno e o hospedeiro, visto que esta estratégia poderá levar a um fármaco com mecanismo de ação que limite a toxicidade da molécula (EDER *et al*, 2014).

[011] Neste contexto a Ciclo do Glioxalato (CG) representa uma via bioquímica explorável na busca de entidades inovadoras no ramo farmacêutico, por estar associada à virulência de determinados micro-organismos patogênicos e ausente no homem (CHEAH *et al*, 2014; LEE *et al*, 2014; NANDAKUMAR *et al*, 2014). Esta via foi descrita por Kornberg & Krebs (1957) e com este trabalho obteve-se a aceitação de que micro-organismos possam sintetizar glicose a partir de compostos contendo dois carbonos.

[012] Dentre os principais fatores que conduziram à elaboração desta via estão a descoberta e/ou reconhecimento das funções das duas enzimas exclusivas deste ciclo: Isocitrato Liase (ICL) e Malato Sintase (MLS). Em um primeiro passo a ICL cliva o isocitrato em glioxilato e succinato. Em seguida, a MLS converte acetil-CoA e glioxilato em malato. O restante do ciclo segue o caminho idêntico ao do TCA, com o malato sendo utilizado na gliconeogênese ou oxidado a oxaloacetato (Figura 1) (AJL, 1956 apud DUNN *et al*, 2009; LORENZ & FINK, 2002; KORNBERG, 1966; KORNBERG & KREBS, 1957; NELSON & COX, 2014; SMITH & GUNSALUS, 1954 apud DUNN *et al*, 2009).

[013] Nos fungos humano-patogênicos do género *Paracoccidioides*, o MLS está presente na via de glioxilato, o que permite que o fungo assimile compostos de dois carbonos. Zambuzzi-Carvalho *et al* (2009) verificaram que os níveis de transcritos, proteínas e atividade específica de *PbMLS* estavam aumentados quando na presença de fontes de compostos contendo dois carbonos e fontes de nitrogênio. Com isto, sugerem que esta enzima atue no ciclo do glioxilato através destas duas vias. Outros achados também relatam que a *PbMLS* está localizada em peroxissomas, na superfície da célula e é segregada. Além disso, a referida enzima desempenha um papel de adesina,

mediando a adesão e a internalização do fungo para as células hospedeiras (DA SILVA NETO *et al*, 2009). A *PbMLS* é regulada durante a transição de micélia para levedura (BASTOS *et al*, 2007) e no stress oxidativo (DE ARRUDA GROSSKLAUS *et al*, 2013). No entanto, inibidores para *PbMLS* ainda não foram investigados.

[014] Uma das alternativas para o sucesso na estratégia deste tipo de investigação refere-se ao rastreio virtual. Nos últimos anos esta ferramenta tem sido empregada na descoberta de novos medicamentos e aplicada com sucesso em pesquisas terapêuticas, particularmente na fase inicial de descoberta, durante a qual o atracamento molecular de alto rendimento desempenha um papel singular (GHOSH *et al*, 2006, LAVECCHIA & DI GIOVANNI, 2006). O rastreio virtual baseado na interação ligante-receptor permite o encaixe de várias moléculas de uma biblioteca no sítio de um receptor conhecido, ou através de uma estrutura tridimensional (3D) resolvida prever a melhor afinidade entre ligantes e receptor (ex: proteína) (COSTA *et al*, 2008).

[015] Estes ligantes são então classificados de acordo com sua afinidade de ligação prevista entre o receptor. Além do tempo e economia de custos associados com a descoberta de ligantes para um alvo proteico, um benefício adicional é o aumento da especificidade dos ligantes previstos, pois o rastreio virtual baseado em interação ligante-receptor é dirigido contra um local de ligação conhecido ou mesmo contra uma conformação especial do receptor (BRUNING *et al*, 2010).

[016] Em função disto, as análises, realizadas em nossos estudos, das estruturas químicas das moléculas selecionados pelo rastreio virtual, revelaram que os melhores compostos classificados pelos parâmetros de afinidade e de eficiência tinham semelhança estrutural com os alcalóides da β -carbolina, principalmente devido à sua porção indol. Além disso, pesquisas na literatura demonstraram que esta classe de alcalóides tem abrangente atividade biológica (CORNEJO-GARRIDO *et al*, 2015), incluindo a actividade anti-fúngica contra *Cândida albicans* (ZHANG *et al*, 2014). Com isto, uma série de alcalóides β -carbolina isolados pelo nosso grupo de pesquisa e de espécies de *Rubiaceae Apocynaceae* foram introduzidas neste estudo.

[017] Desta forma, propomos que sejam utilizados como protótipos de fármacos no tratamento de infecções fúngicas, os compostos obtidos por meio de triagem virtual, baseada nos estudos de interação e atracamento molecular entre ligante/receptor, e os

alcalóides β -carbolina que inibiram a atividade da *PbMLSr*, o crescimento de espécies *Paracoccidioides*, e aderência do fungo e da *PbMLSr* para os componentes da matriz extracelular.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[018] Neste trabalho, a enzima *PbMLS* foi selecionada como alvo principal para a busca racional de fármacos contra a PCM. Conjuntos conformacionais foram determinados através da modelagem por homologia e Dinâmica Molecular (DM). A triagem de compostos candidatos a inibir *PbMLS* foi executada seguindo protocolo de atracamento molecular, capaz de classificar compostos do banco ZINC por afinidade e eficiência. Com base no mecanismo de interação destas moléculas com *PbMLS* foi possível identificar a porção β -carbolina como uma estrutura chave para inibição. Baseado nesta estrutura, nove alcaloides foram selecionados e testados *in vitro*. Destes alcaloides quatro apresentaram atividade antifúngica, haja vista à sua ação inibitória sobre o crescimento de espécies de *Paracoccidioides* sp. Estes alcaloides também inibiram a atividade da *PbMLSr* e aderência do fungo e da *PbMLSr* aos componentes da matriz extracelular. Além disto, os mecanismos primários das interações na bolsa de ligação de *PbMLS* foram identificados e comparados com acetil-CoA, substrato da *PbMLS*. Verificou-se que a natureza anfipática dos compostos, concomitantes com a presença da porção β -carbolina, tem papel crucial para a afinidade dos mesmos na bolsa de ligação de *PbMLS*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[019] Os compostos aqui selecionados foram classificados de acordo com um protocolo estabelecido, a qual envolve diferentes etapas, caminho este referente à fase de desenvolvimento e planejamento racional de fármacos. Assim, houve o emprego de ferramentas *in silico* e *in vitro*.

Exemplo 1

Descrição da preparação do receptor e ligantes para o estudo *in silico*

[020] A estrutura 3D da *PbMLS* ainda não foi resolvida experimentalmente, assim, propomos um modelo com base na estrutura 3D da malato sintase A de *Escherichia coli* e *Bacillus anthracis* (PDB ID: 3CV1A). Este modelo foi construído a partir do servidor I-TASSER (ZHANG, 2008). A qualidade da estrutura prevista foi

avaliada por meio do programa ERRAT do servidor do laboratório NIH-MBI (COLOVOS & YEATES, 1993). O mapa de Ramachandran de PbMLS foi preparado no servidor da web RAMPAGE (LOVELL *et al*, 2003), e o servidor Verify 3D foi utilizado para avaliar os ambientes dos aminoácidos (LUTHY *et al*, 1992). As simulações de DM de PbMLS foram realizadas através do programa GROMACS (BERENDSEN *et al*, 1995; LINDAHL *et al*, 2001; PRONK *et al*, 2013) para reproduzir a estabilidade estrutural deste receptor no seu ambiente nativo. O programa g_cluster (ferramenta do GROMACS) foi usado para determinar as conformações que melhor representaram as estruturas durante a trajetória obtida na simulação. O algoritmo gromos, tal como descrito por Daura *et al* (1999), foi selecionado para esta finalidade. Um ponto de corte de 0,3 nm foi utilizado para distinguir os conjuntos com base no perfil RMSD e os clusters foram determinados com base nos valores de RMSD dos átomos. A estrutura de maior estabilidade dentre os clusters determinados foi utilizada para o atracamento molecular.

[021] As estruturas dos ligantes foram obtidas a partir do catálogo de produtos naturais do ZINC database (IRWIN & SHOICHET, 2005). Um total de 89.415 compostos foi considerado para os testes. As estruturas 3D dos compostos alcaloides foram gerados através do servidor GlycoBioChem PRODRG2 (SCHÜTTELKOPF & VAN AALTEN, 2004).

Exemplo 2

Avaliação do atracamento molecular de acordo com a classificação do ligante segundo critério de afinidade

[022] Estudos de atracamentos moleculares necessitam de tratamento das interações entre o ligante e o receptor através de funções que possam revelar os aspectos mais fundamentais da afinidade entre eles. AutoDockVina utiliza o valor da função de pontuação com respeito aos seus argumentos (TROTT & OLSON, 2010). Este programa permite uma rápida identificação do mínimo da função dentro da grade definida e inclui uma pesquisa local estocástica. Assim, os testes de atracamento molecular foram limitados a uma grade (GRID), construída com ferramenta do MGLTools, que envolveu todos os bolsos da proteína, os quais foram definidos por

meio do DogSiteScorer, um servido de análise e previsão de sítios ativos (VOLKAMER *et al*, 2010).

[023] AutoDockVina utiliza uma função de conformação, g , dada pela equação:

$$g(c_{inter}) = \frac{c_{inter}}{1 + wN_{rot}}$$

onde NROT é o número de ligações rotativas ativas entre os átomos pesados do ligante (torções) e w é o peso associado, C_{inter} é uma função capaz de incorporar as principais contribuições para a energia livre de ligação, que depende da distância entre os átomos. As interações do tipo ligações de hidrogênio, interações do tipo π e σ não foram tratadas separadamente, mas efetivamente incorporada em uma função que depende da distância entre os átomos. Os valores de g referem-se ao escore do AutoDockVina, o qual foi usado como parâmetro para a classificação dos ligantes segundo a sua afinidade.

Exemplo 3

Avaliação do atracamento molecular de acordo com a classificação do ligante segundo critério de eficiência

[024] Abad-Zapatero (2007) propôs uma função simples capaz de selecionar compostos não apenas por afinidade, mas também por critérios de eficiência conforme a equação abaixo:

$$EL = \frac{\Delta G}{n}$$

[025] Tal função depende da energia de ligação (ΔG) entre o ligante e receptor, bem como o número total de átomos (n), pois classifica a eficiência de ligantes de acordo com o seu tamanho. Neste caso, os compostos com menores números de átomos e alta afinidade são considerados mais eficientes. Com isto, substituímos ΔG na Eq. 7 pelo escore do AutoDockVina e limitamos a pontuação a um máximo pré-definido. Isto assegura a seleção de pequenos ligantes com estabilidade na bolsa de ligação.

Exemplo 4

Determinação do rastreo virtual

[026] Por intermédio do AutoDockVina, um total de 89.415 compostos do ZINC database foram rastreados com base em sua função de pontuação. Foram estabelecidos dois tipos de critérios de classificação: (i) afinidade – o que envolveu a seleção de 100 compostos de acordo com o perfil de energia - e (ii) eficácia – o que envolveu a seleção

dos 100 compostos com os menores valores de EL (Eficiência de ligantes; Eq. 3) e com uma pontuação máxima limitada a -8,0 Kcal/mol.

[027] Com base no critério de afinidade e eficiência, selecionamos os 100 ligantes que exibiram as pontuações mais baixas em cada grupo, conforme determinado por AutoDockVina. Para cada ligante, 1.000 simulações independentes foram realizadas, o que aumentou a eficiência na escolha. Assim, a construção dos histogramas das energias mais baixas alcançadas em cada simulação, nos ajudou a selecionar ligantes com estabilidade e com estados mais claramente definidos. Os ligantes com um número de ocorrências superior a 50% em uma dada energia/conformação foram considerados bem sucedidos. No entanto, se esta condição não foi satisfeita, os ligantes não foram classificados por suas pontuações. Para simulações envolvendo o alcalóides e a Acetil-CoA, houve também 1000 atracamentos moleculares, bem como a construção de um histograma de pontuação para cada molécula.

[028] A área de superfície acessível (ASA) ao solvente de cada composto foi calculada usando a função `get_area` do PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Schrodinger) e as interações entre os ligante e receptor foram visualizadas através do Discovery Studio 2.5 da Accelrys.

Exemplo 5

Química experimental – obtenção dos alcaloides para testes *in vitro*

[029] Os alcaloides 1, 2 e 3 foram isoladas a partir de *Psychotria prunifolia* (KATO *et al*, 2012), os alcaloides 4 e 5 foram isolados a partir *Galianthe ramosa* (DE FREITA *et al*, 2012), os alcaloides 6 e 7 foram isolados a partir de *Rauvolfia bahiensis* (KATO *et al*, 2002), e alcaloides 8 e 9 foram isolados a partir *Rauvolfia weddellianna* (dados não publicados).

Exemplo 6

Obtenção de PbMLSr

[030] PbMLSr foi obtida como descrito por Da Silva Neto *et al.* (2009). Em resumo, os cDNA que codifica PbMLS foram inseridos no vetor de expressão pET-32a (+) (Novagen, Madison, WI, EUA). O plasmídeo resultante foi transferido para a estirpe de *E. coli* BL21 C41 (DE3). A PbMLSr foi purificada utilizando o ácido níquel-

nitrilotriacético(Ni-NTA)(Qiagen, Germantown, MD, EUA), e depois houve a adição de EKMax enteroquinase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

Exemplo 7

Avaliação da capacidade inibitória da proteína PbMLSr pelos compostos alcaloides

[031] Os ensaios de atividade foram realizados como descrito por Roucourt *et al* (2009) e Zambuzzi-Carvalho *et al* (2009), com algumas modificações. Resumidamente, estes testes foram realizados através de um ensaio de ponto final para medir a quantidade de acetil-CoA. A quantidade de grupos tiol livres de CoA foi determinada utilizando 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) (ORNSTON & ORNSTON, 1969). A absorção a 415 nm foi medida utilizando um leitor de microplacas (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA). DTNB foi adicionado a uma concentração final de 2mM. A mistura de reação padrão continha 2 µg de PbMLSr, 100 mM de Tris-HCl, 5 mM de MgCl₂, 2 mM de glioxilato (Sigma), e 1 mM de acetil-CoA (Sigma).

[032] Ácido pirúvico e os alcaloides foram adicionados a uma concentração de 17 µg/ml como controlo positivo e para avaliar o potencial inibidor, respectivamente. As reações foram incubadas durante 30 minutos a pH 7,5. As actividades específicas foram determinadas em unidades por microlitro de proteína. As concentrações dos compostos alcaloides que variaram de 6 a 36 µg/mL foram testadas para encontrar a concentração que inibiu a actividade PbMLS. Todas as experiências foram realizadas em triplicado.

Exemplo 8

Avaliação da capacidade inibitória sobre as células leveduriformes de *Paracoccidioides* pelos compostos alcaloides

[033] Estirpe de células leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis* 18 (Pb18) foram cultivadas em meio de Fava-Netto (1955) durante 7 dias a 36 ° C. O método de CLSI M27-A3 (CLINICAL 2008) não está disponível para uso com fungos dimorfos, tais como aqueles do género *Paracoccidioides*. Assim, neste estudo, para determinar a Concentração Inibitória Mínima CIM e avaliar o crescimento de células leveduriformes de Pb18, optamos por utilizar o método padrão descrito por de Paula e

Silva *et al* (2013), que é um método colorimétrico baseado no documento M27-A3 (CLINICAL 2008), mas com adaptações e a adição de alarme-Blue (BioSource, Carlsbad, CA, EUA).

[034] Os inóculos foram preparados em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado com glicose a 2% e tamponado a pH 7,0 usando 0,165 M de ácido morfolinopropanosulfônico (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A suspensão de células de levedura *Pb18* foi ajustado para uma concentração final no intervalo de $0,5 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^3$ células/ml em meio RPMI 1640. Em placas de 96 cavidades, os alcaloides foram adicionados em diluições seriadas em concentrações variando de 6 µg/ml a 300 µg/ml. As placas foram incubadas a 36 °C e 150 rpm durante 48 h. Após este período, alarme-Blue (BioSource) foi empregado de acordo com as instruções do fabricante, e as placas foram incubadas durante 24 h adicionais para um total de 72 h antes da leitura final CIM. A menor concentração de agente antifúngico que inibiu substancialmente o crescimento do microrganismo foi determinado visualmente, no ponto em que não houve alteração na cor azul original do reagente

Exemplo 9

Avaliação de inibição da aderência de *PbMLSr* e *Pb18* à componentes de matriz extracelular (ECM) pelos compostos alcaloides

[035] Devido ao fato da *PbMLS* atuar como adesina, se ligando a fibronectina, colágeno tipo I e IV, investigamos se os alcaloides 3, 4, 6 e 8 seriam capazes de realizar a inibição desta aderência. Para isto, foi utilizado Far-Western blot. *PbMLSr* foi submetida a SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nylon. Após o bloqueio durante 4h, com 1,5% de Albumina de Soro Bovino (BSA) em 10 mM de solução Salina-Tamponada-com-Fosfato-leite (PBS-leite) e lavagem três vezes (durante 10 minutos de cada vez) em 10 mM de Triton X-100 em PBS (PBS-T), as membranas foram incubadas com 20 µg/ml de fibronectina ou 30 µg/ml de colagénio tipo I e IV, diluído em PBS-T com 2% de BSA durante 90 minutos e depois lavadas três vezes (durante 10 min de cada vez) em PBS-T. Cada alcaloide foi adicionado a uma concentração de 60 µg/ml. As membranas foram incubadas durante 18h com anticorpos de anti-fibronectina de coelho, anti-colágeno tipo I ou anti-colágeno tipo IV em PBS-T

com 2% de BSA (diluído 1:100). As transferências foram lavadas com PBS-T e incubadas com marcador de peroxidase imunoglobulina de cabra anti-coelho (diluído 1: 1000). As transferências foram lavadas com PBS-T, e os sinais reativos foram desenvolvidos com o peróxido de hidrogénio e diaminobenzidina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como o reagente cromogénico. O controlo positivo foi obtido através da incubação de *PbMLSr* com o anticorpo anti-*PbMLSr* policlonal (diluído 1: 500), e a reação foi desenvolvida como descrito acima.

[036] Também utilizamos a metodologia de ELISA conforme descrito por Da Silva Neto *et al* (2009). Resumidamente, 96 poços de microtitulação de placas de ELISA foram sensibilizados com 10 µg/ml de proteínas da ECM durante uma noite a 4°C e, em seguida, bloqueadas com BSA a 2%, 10% de Soro Fetal de Bovino (FBS), e 1% de leite desnatado. Para avaliar a percentagem de inibição da adesão de células de levedura *Pb18* ao ECM pelos compostos testados, cada alcaloide foi adicionado separadamente a uma concentração de 60 µg/ml, e a mistura foi incubada durante 60 minutos. Um total de 10⁶ células/ml de células leveduriformes de *Pb18* foram adicionados e incubados durante 16h a 37°C. Para analisar a percentagem de inibição da adesão de *PbMLSr* à ECM (razão 1: 1; 5 µg de cada), *PbMLSr* e cada composto, a uma concentração de 60 µg/ml, foi adicionado separadamente à placa. Calculou-se a percentagem de inibição de adesão da *PbMLSr* e da célula leveduriforme de *Pb18* à ECM pelos compostos testados.

[037] A reação foi desenvolvida utilizando tampão de citrato a pH 4,9, conjugado com o-fenilenodiamina como substrato cromogénico. Os controles negativos foram realizados utilizando unicamente *PbMLSr* ou ECM. Os controles positivos foram realizadas utilizando anticorpos anti-*PbMLSr*, anti-fibronectina, anticorpos anti-colagénio do tipo I e anti-colagénio tipo IV. A absorvância a 490 nm foi medida e os resultados foram analisados usando o software MicroCal Origin versão 5.0 (MALVEM, 1998).

Exemplo 10

Determinação da influência dos compostos alcalóides na inibição da adesão de *PbMLSr* e *Paracoccidioides Pb18* à células A549 e MRC5

[038] As linhagens de células A549 e MRC5 foram usadas para ensaios de adesão para avaliar o padrão de adesão de células leveduriforme de *Pb18* e *PbMLSr*, tal como descrito por Mendes-Giannini *et al* (2004). A549 corresponda a um linhagem celular de adenocarcinoma de pulmão humano obtido a partir da American Type Culture Collection (Rockville, MD). Estas células foram cultivadas em meio de Ham's F-12 suplementado com 10% de soro fetal de vitelo inativado pelo calor. A linhagem de células MRC5 foi desenvolvido a partir de tecido de pulmão, e a morfologia das células é do tipo fibroblastos. Estas células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal de vitelo inativado pelo calor. As células foram cultivadas em frascos de 75 mm³ (Corning) e mantida a 36,5 °C.

[039] Após 3 a 4 dias, a monocamada de linhagem celular formada foi tripsinizadas, e placas de células de 96 poços foram preparadas com 5x10⁴ células/ml. Resumidamente, a monocamada de células foi lavada com 1 ml de solução de tripsina a 0,2% e 0,02% Versene (ATV), e, em seguida, foi adicionado 1 ml de ATV. Na sequência de 1 a 2 minutos, as células foram misturadas e no meio foi acrescentado 10% FBS. Nesta fase, a tripsina foi neutralizada pelos 10% de FBS presente no meio de cultura. O volume total da suspensão celular obtida foi transferida para frascos novos para obter concentrações de células de 10⁶ células/ml. As células foram subcultivadas por 2 dias de antecedência. Este procedimento incluiu tripsinização com 2 ml de ATV e a adição de 20 ml de meio de cultura. Quinhentos microlitros desta mistura foi colocadas em cada poço de uma placa de 24 poços (5 x10⁴ células/poço).

[040] Uma concentração de 60 µg/mL de cada alcaloide foi adicionado por poço. Depois de ajustar o inóculos de células leveduriformes *Pb18* (1x10⁶ a 5x10⁶ células/ml), a infecção foi realizada durante 15h. Para os ensaios de *PbMLSr*, uma concentração de 5 µg/ml de cada alcaloide foi usada. Os controles contendo inóculos de células leveduriformes *Pb18* (1x10⁶ a 5x10⁶ células/ml) ou *PbMLS* sem adição dos compostos foram desenvolvidos. Inicialmente, o meio anterior foi removido dos poços contendo a monocamada de linha de células, e 100 µL de meio fresco foi adicionado a cada poço na placa correspondente e depois incubadas a 37 °C durante 2h. As placas infectadas foram

lavadas três vezes com PBS, fixadas com 500 µL de 4% de p-formaldeído, e incubadas durante a noite a 4 ° C.

[041] Para realizar o ensaio de imunofluorescência indireta, as células fixadas foram permeabilizadas com 0,25% de Triton X-100 em PBS (PBS-T) e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após a lavagem com PBS-T, as células foram incubadas com uma solução (2,5% de BSA, 1% de leite desnatado, 8% de soro fetal de bovino) durante 30 minutos de bloqueio a temperatura ambiente. Depois disso, a solução de bloqueamento foi descartada, e anticorpo policlonal anti-*Paracoccidioides* (1: 100) foi adicionado numa solução de bloqueio e incubadas a 37 °C durante 1h. Após lavagem com PBS-T, a monocamada de células foi incubada com anticorpo secundário conjugado anti-IgG de coelho e com anticorpo conjugado Alexa 594 (1: 400) a 37 °C durante 1h. A seguir, o ECM foi marcada com anticorpo anti-fibronectina e anti-colagénio tipo I ou IV (1:100) a 37 °C durante 1h. Após lavagem com PBS-T, a monocamada foi incubada com IgG conjugada anti-coelho e com anticorpo conjugado Alexa 594 (1: 400) a 37 °C durante 1h. Por fim, a monocamada foi lavada novamente com PBS-T, e 100 µL de 0,5 µg/ml 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) foi adicionado para a incubação a 37 °C durante 1h. Após as lavagens sucessivas com PBS-T, a reação foi fixada com 1% de p-formaldeído.

[042] A infecção fúngica potencial foi observado usando imagens processadas pelo IN Cell Analyzer 2000 system (GE Healthcare). Todos os núcleos foram coradas com DAPI, e os filamentos de actina foram revelados com phalloidinfluorescein isothiocyanate (FITC). Células leveduriformes de *PB18* e *PbMLSr* foram detectados com um anticorpo conjugado Alexa-594. Todas as experiências foram repetidas pelo menos três vezes. Os resultados foram processados por meio de intensidade de fluorescência, utilizando o software IN Cell Investigator e analisados estatisticamente com o software Origin lab 7.5.. Os dados foram avaliados utilizando uma análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. Um valor $P < 0,05$ foi considerado significativo.

Exemplo 11

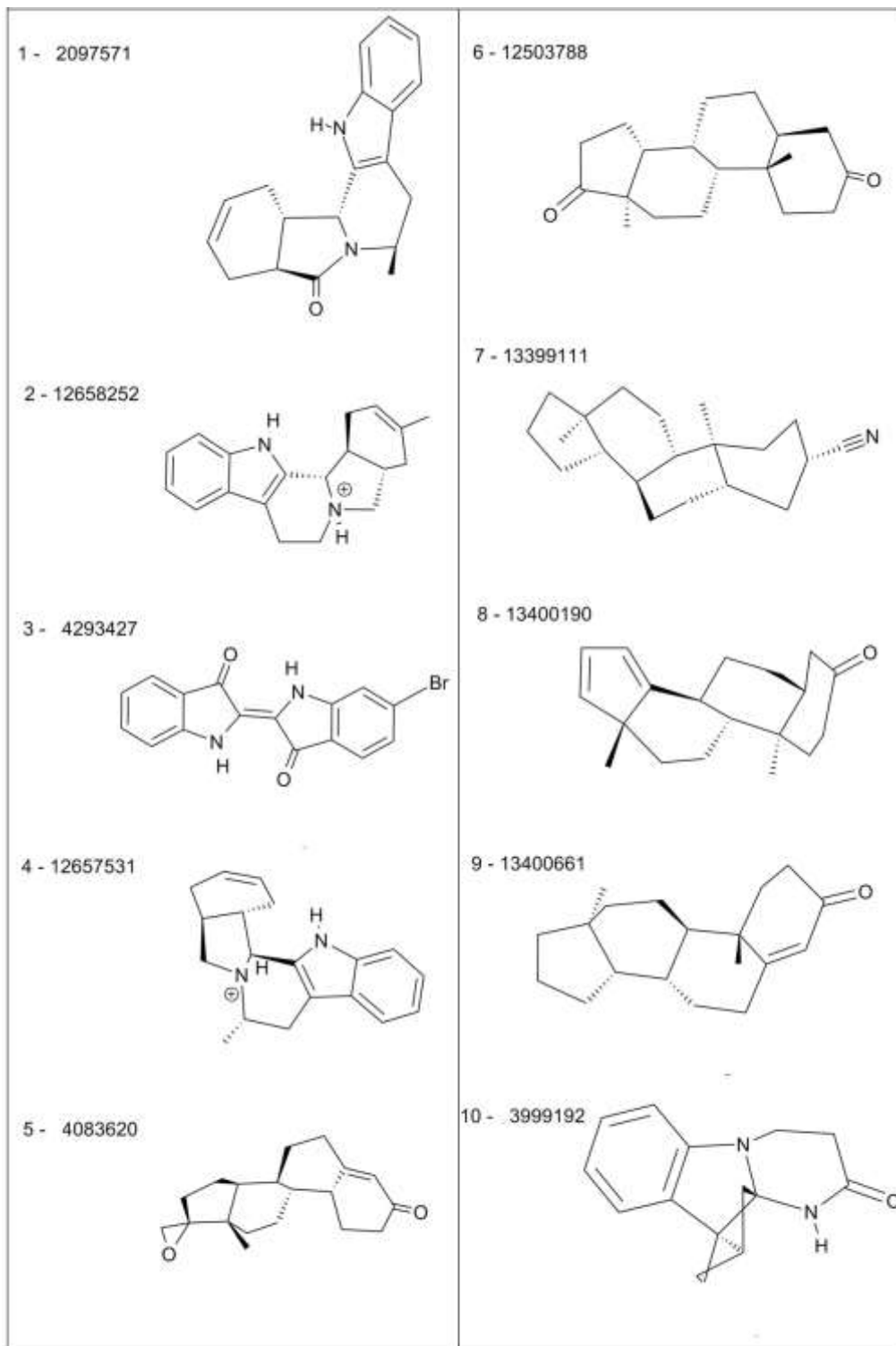
Avaliação da citotoxicidade de compostos alcaloides nas linhagens celulares A549 e MRC5.

[043] O ensaio de citotoxicidade celular foi realizada de acordo com Mosmann (1985). A citotoxicidade dos alcalóides para linhagens celulares A549 e MRC5 foi avaliada através método de redução do sal de tetrazólio (MTT) [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. As células foram cultivadas em meio de Ham's F-12, suplementadas com 10% de soro fetal de vitelo inativado pelo calor e mantida a 36,5 ° C. As concentrações que variam de 2,5 a 5,0 x 10⁴ células/mL foram utilizadas para a formação de células em monocamada. Os alcaloides em concentrações variando entre 12 µg/ml a 600 µg/ml, foram mantidas em contato com as células durante 24 h. As células foram então tratadas com 5 mg/ml MTT (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e incubou-se durante 4 h. Após a formação dos cristais de formazano, foi adicionado 100 µL de isopropanol para solubilizar o precipitado, e o resultado foi determinada pela alteração na cor do meio. A absorvância de formazano foi quantificada através de um ensaio de imunossorvente ligado a enzima utilizando um leitor de ELISA em 560 nm. O peróxido de hidrogénio foi utilizado como um controlo positivo. Os valores de índice de selectividade (SI) foram calculados utilizando a relação entre a concentração inibidora 50% (IC₅₀) de células de mamífero para a IC₅₀ do fungo.

REIVINDICAÇÕES

1. UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES **caracterizada por** ser candidato a protótipo de antifúngico, haja vista que num banco de moléculas com 89415 compostos, foram os que apresentaram maior complementaridade estrutura a *PbMLS*, com significativa afinidade e especificidade pela macromolécula;
2. UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** sua afinidade ao sítio catalítico de *PbMLS*.
3. UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** estabelecerem contatos com aminoácido de *PbMLS* semelhantes aos encontrados na interação de *PbMLS* e seu substrato natural, acetil-CoA;
4. UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES **caracterizada por** ser candidato a protótipo de antifúngico, haja vista sua capacidade de inibir a atividade da *PbMLSr*, enzima chave para o estabelecimento infeccioso de *Paracoccidioides* sp e outros microrganismos;
5. UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES de acordo com a reivindicação 4 **caracterizada por** sua ação inibitória sobre o crescimento de espécies de *Paracoccidioides* sp;
6. UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES de acordo com a reivindicação 4 **caracterizada por** sua capacidade de inibir aderência do fungo e da *PbMLSr* aos componentes da matriz extracelular e as células A549 e MRC5.

FIGURA 1



RESUMO

UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS NATURAIS NO TRATAMENTO DE MICOSES

A patente de invenção se refere à descoberta de novos compostos como potenciais candidatos a protótipos de fármacos. Neste contexto, apresentamos 20 compostos selecionados do banco ZINC, os quais apresentaram significativa complementaridade estérica com o sítio catalítico de *PbMLS*, conformação energeticamente favoráveis, o que contribuiu para uma alta afinidade e especificidade destas entidades químicas que tiveram as melhores funções de pontuação. Além disto, destaca-se que estas moléculas estabelecerem contatos com aminoácido de *PbMLS* semelhantes aos encontrados na interação de *PbMLS* e seu substrato natural, acetil-CoA. Também referimos à quatro alcaloides como potenciais candidatos a protótipos de fármacos, uma vez que estes apresentaram ação inibitória sobre o crescimento de espécies de *Paracoccidioides* sp, inibiram a atividade da *PbMLSr* e aderência do fungo e da *PbMLSr* aos componentes da matriz extracelular e à células A549 e MRC5. Assim, esta nova descoberta tem como objetivo o desenvolvimento de antifúngicos inovadores e mais específicos, com mecanismo de ação eficiente e que limite os efeitos tóxicos decorrente de seus uso aos pacientes.