

Artigo

CYP51: Uma Boa Ideia?

Sueth-Santiago, V.; Franklim, T. N.; Lopes, N. D.; Lima, M. E. F.*

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (2), 539-575. Data de publicação na Web: 21 de fevereiro de 2015

<http://www.uff.br/rvq>

CYP51: Is it a Good Idea?

Abstract: In this paper we discuss the main aspects of drugs targeting 14 α -demethylase (CYP51) an enzyme belonging to the superfamily of cytochrome P450. Different isoforms of CYP51 are present in all living organisms, since the products of its metabolic pathway, such as steroids, are of fundamental importance in the homeostasis while maintaining the integrity, fluidity and permeability of the cell membranes. In man, the main steroid in the cell membrane is cholesterol, unlike what occurs in fungi and some protozoa, which instead have ergosterol. Apart from infections caused by fungus, whose impact on public health has grown markedly, we highlight the hemoflagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease (CD), or American trypanosomiasis. The progress achieved in recent decades in understanding the mechanism of action of antifungal azoles in clinical use as well as the knowledge about the structural differences between the isoforms of CYP51 present in fungi and trypanosomatids allowed the design and synthesis of new molecules that are currently under clinical development for the treatment of CD. The drugs that act inhibiting the CYP51 may also bind to other oxidases such as aromatases responsible for the synthesis of hormones, as well as other cytochromes involved in the detoxification of xenobiotics. The toxic effects of new CYP51 inhibitors should be studied, in order to make possible the evaluation of the cost-effective use of molecules that act by this mechanism of action and that may become drugs for the treatment of infections caused by fungi and protozoa.

Keywords: Sterol 14 α -demethylase; azole drugs; steroids; *Trypanosoma cruzi*; cytochrome P450.

Resumo

Neste trabalho é feita uma revisão dos principais aspectos do desenvolvimento de fármacos que possuem como alvo bioquímico a 14 α -desmetilase (CYP51), enzima pertencente à superfamília dos citocromos P450. Diferentes isoformas da CYP51 estão presentes em todos os organismos vivos, uma vez que os produtos da via metabólica na qual esta enzima participa, os esteroides, tem importância fundamental na manutenção da homeostasia, mantendo a integridade, fluidez e a permeabilidade da membrana celular. No homem o principal esteroide produzido por esta via metabólica é o colesterol, diferentemente do que ocorre nos fungos e em alguns protozoários, que possuem ergosterol na membrana celular. Além das infecções causadas por fungos, cujo impacto na área de saúde pública tem crescido de forma marcante, destacamos também a doença de Chagas (DC), enfermidade causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Trabalhos desenvolvidos nas últimas décadas, a partir da compreensão do mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos de uso clínico, além das diferenças estruturais existentes entre as isoformas da CYP51, presentes em fungos e em tripanossomatídeos, permitiram o planejamento e a síntese de novas moléculas que se encontram em fase de desenvolvimento clínico para o tratamento da DC. Nesta área de estudo, deve-se levar em consideração que os fármacos inibidores da biossíntese de ergosterol que interagem com a CYP51, podem também se ligar a outras oxidases, como aromatases, responsáveis pela síntese de hormônios, além de outros citocromos envolvidos na detoxificação de xenobióticos. Os efeitos tóxicos de novos inibidores de CYP51 devem ser estudados, de forma a tornar possível a avaliação do custo-benefício no uso de moléculas que atuam via este mecanismo de ação e que possam vir a se tornar fármacos para o tratamento de diferentes infecções causadas tanto por fungos quanto por tripanossomatídeos.

Palavras-chave: Esterol 14 α -desmetilase; fármacos azólicos; esteroides; *Trypanosoma cruzi*; citocromo P450.

* Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, BR 465 Km 07, CEP 23890-000, Seropédica-RJ, Brasil.

✉ marco@ufrj.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150024](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150024)

CYP51: Uma Boa Ideia?

Vitor Sueth-Santiago, Tatianny N. Franklim, Natália D. Lopes, Marco Edilson F. de Lima*

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, BR 465 Km 07, CEP 23890-000, Seropédica-RJ, Brasil.

* marco@ufrj.br

Recebido em 31 de janeiro de 2015. Aceito para publicação em 31 de janeiro de 2015

1. Introdução

- 1.1. O citocromo P450
- 1.2. Esteroides e processos enzimáticos oxidativos
- 1.3. Biossíntese do ergosterol
- 1.4. Identificação da CYP51
- 1.5. O mecanismo de desmetilação

2. CYP51 no desenvolvimento de fungicidas

- 2.1. Fármacos antifúngicos inibidores da CYP51
- 2.2. Novos antifúngicos azólicos

3. CYP51 no desenvolvimento de substâncias tripanocidas

4. Questões de seletividade

5. Conclusões e perspectivas

1. Introdução

1.1. O Citocromo P450

O citocromo P450 é uma superfamília de hemoproteínas encontradas em todos os indivíduos vivos de diferentes Reinos, tanto eucariotos quanto procariotos, e possuem a função de realizar processos de transferência de elétrons no meio biológico. O nome citocromo foi proposto por Sato e Omura, quando descobriram uma fração enzimática do microsoma hepático de coelhos, a qual

possuía uma absorção característica no espectro luminoso na região do visível, sendo capaz de se ligar de forma transiente ao monóxido de carbono e isocianeto de etila.¹

As enzimas do citocromo P450 são metaloenzimas que contém um grupo heme, um grupo prostético contendo um íon ferroso complexado por nitrogênios pirrólicos de um macrociclo denominado porfirina (**Figura 1**), sendo esta estrutura ancorada à enzima através da ligação entre um átomo de enxofre de um resíduo de cisteína e o átomo de ferro, que funciona como um ácido de Lewis.²

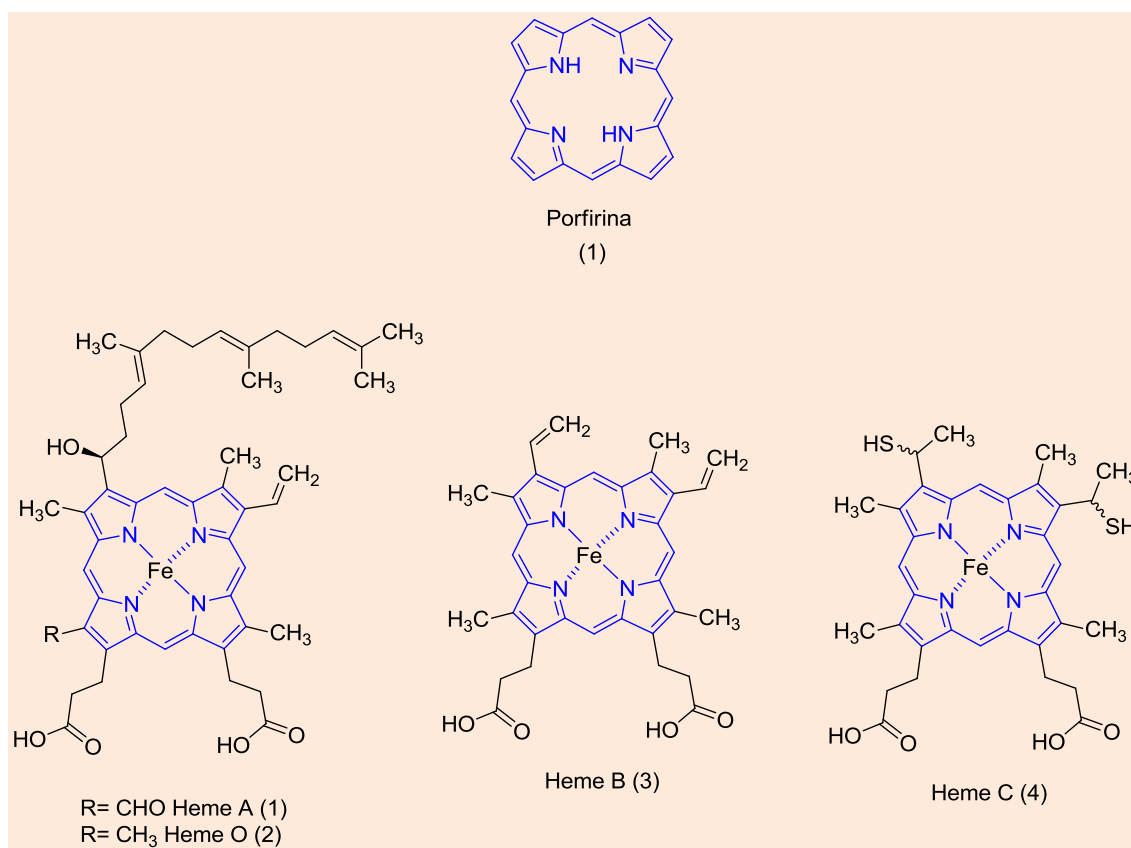
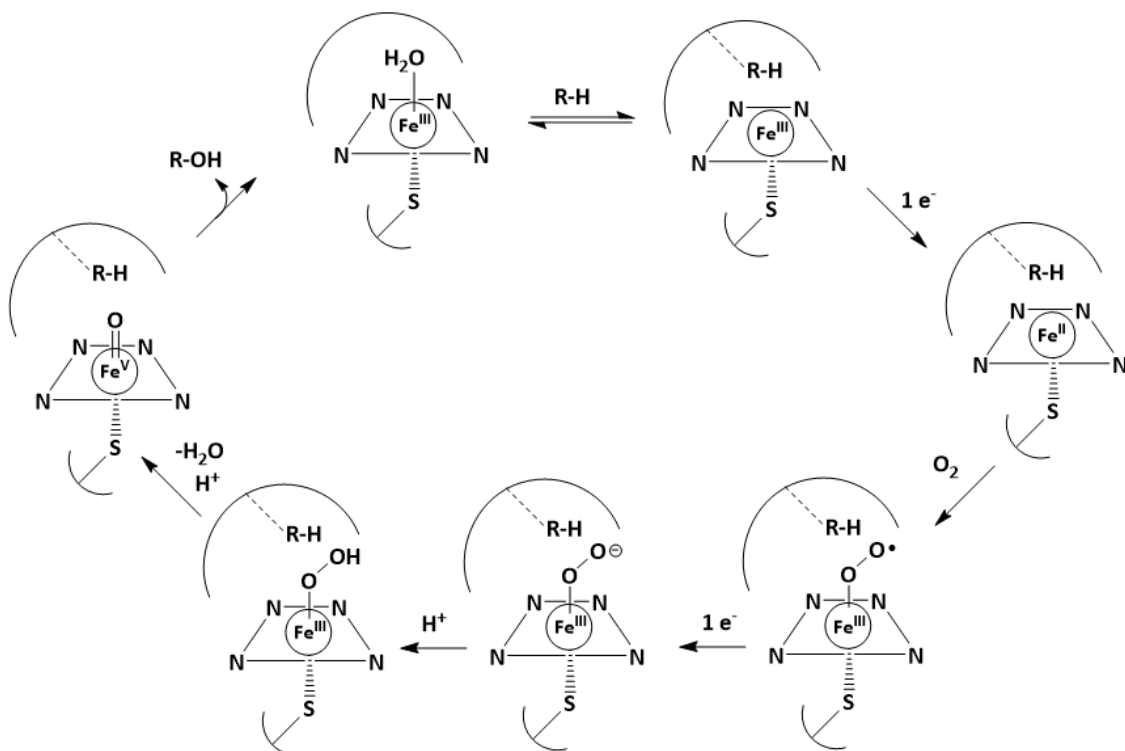


Figura 1. Estrutura básica da porfirina e de alguns grupos heme comumente encontrados em enzimas do citocromo P450

A reação mais comum promovida pelas enzimas do citocromo P450 envolve a inserção de um átomo de oxigênio em estruturas orgânicas pela clivagem da ligação C-H (**Esquema 1**),³ gerando compostos hidroxilados que são mais polares do que seus precursores. Esta estratégia é empregada tanto no metabolismo de substâncias endógenas, como esteroides, ácidos biliares, ácidos graxos, prostaglandinas e leucotrienos, quanto na oxidação de xenobióticos como fármacos, poluentes e toxinas,⁴ que uma vez hidroxilados podem sofrer metabolismo de fase 2 para posterior excreção.⁵ Cada ciclo de inserção de uma

hidroxila no substrato orgânico (R-H) demanda dois elétrons, conforme representado no **Esquema 1**. Esses elétrons que entram no ciclo catalítico de oxidação do citocromo P450 provém de ciclos que envolvem processos de redução, como por exemplo ferredoxinas e flavoproteínas (cujo cofator é a flavina adenina dinucleotídeo, FAD).⁶ Os elétrons utilizados provém da oxidação de nucleotídeos piridínicos, como nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADH) e seu análogo fosforilado (NADPH), sendo transportados através de ferredoxinas solúveis que possuem o grupamento [Fe₂S₂].⁷



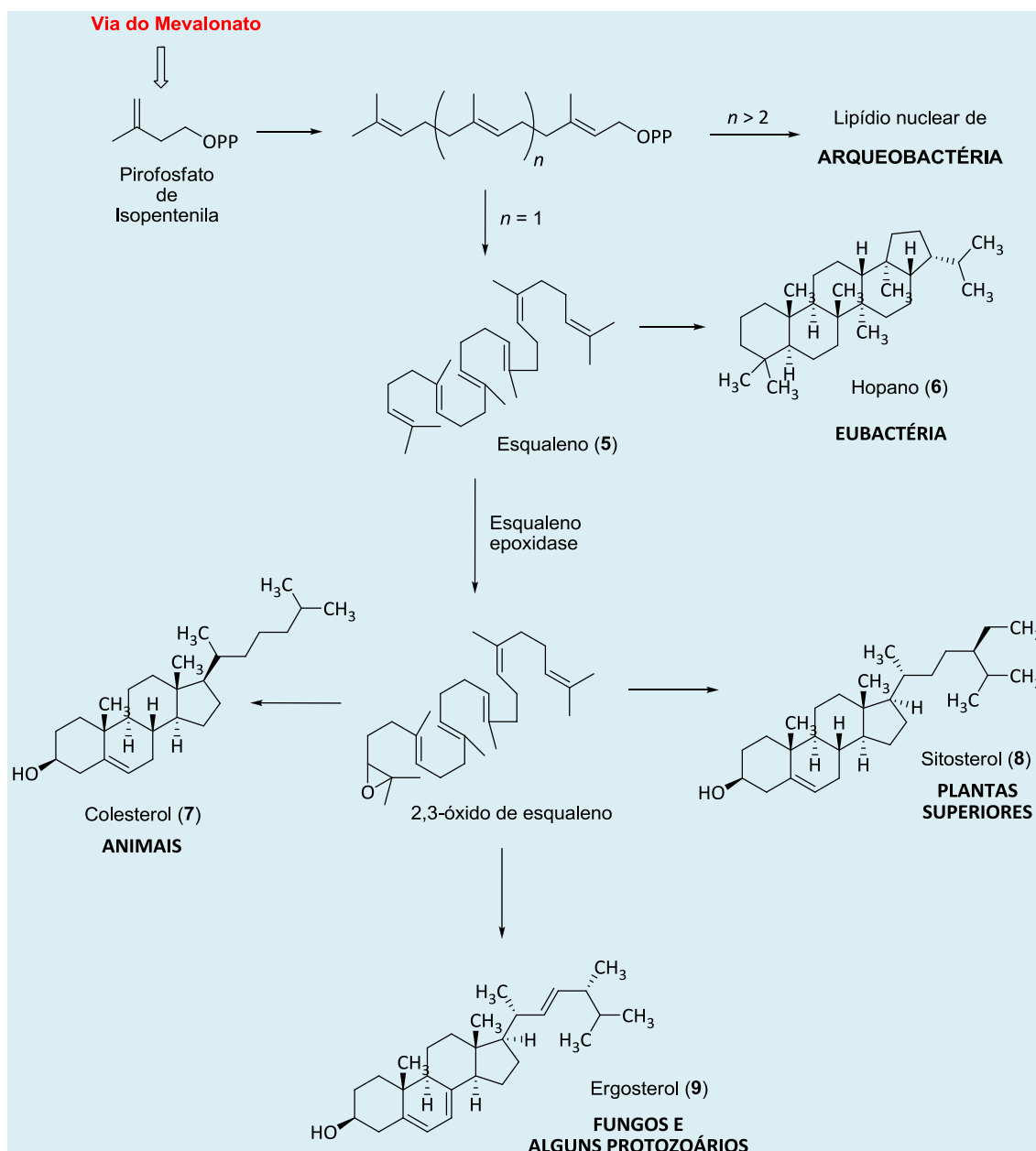
Esquema 1. Representação do ciclo catalítico geral de enzimas do citocromo P450 na oxidação de ligações C-H. Adaptado de Meunier e colaboradores, 2004³

1.2. Esteroides e os processos enzimáticos oxidativos

Dentre os substratos de enzimas do citocromo P450 encontram-se os esteroides, que são biomoléculas que possuem como principal função biológica a manutenção das propriedades das membranas celulares dos organismos vivos.⁸ Esteroides são derivados do isopreno que atuam na membrana celular modulando sua fluidez, integridade e permeabilidade, sendo então uma classe de moléculas indispensável à manutenção da vida. A biossíntese desses esteroides difere significativamente entre os Reinos, sendo o óxido de esqualeno um intermediário comum a todos os eucariotos. A partir deste ponto, há uma divergência de rotas biossintéticas

que dão origem a diferentes esteroides: no reino animal, o principal esteroide é o colesterol. Nos fungos, o principal esteroide é o ergosterol e nas plantas, o sitosterol (**Esquema 2**).

Essa diferença nas rotas biossintéticas pode apresentar-se como uma vantagem no planejamento de substâncias com atividade biológica, uma vez que esta condição permite o estudo de compostos quimioterápicos seletivos para um parasito e inócuos para o hospedeiro, já que a partir do 2,3-óxido de esqualeno as vias bioquímicas são diferentes para a síntese do colesterol (um lipídeo de membrana presente nos mamíferos) e do ergosterol (lipídeo equivalente, presente nas membranas de fungos e alguns protozoários, como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*).



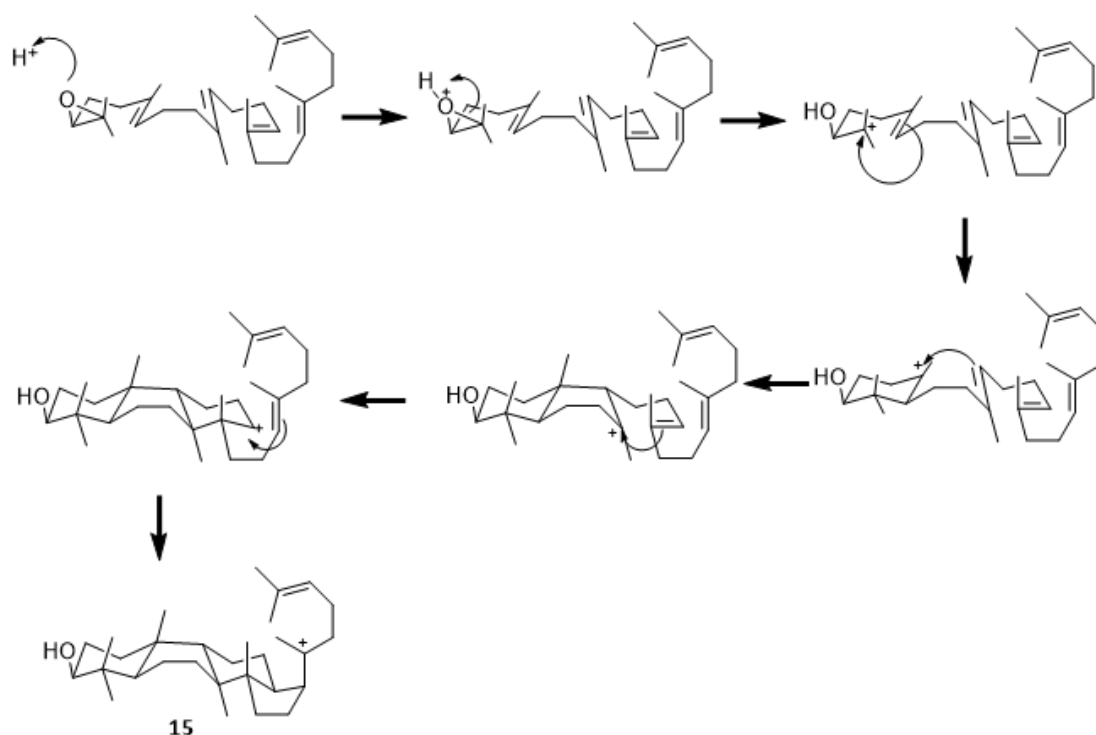
Esquema 2. Biossíntese comparativa de esteroides estruturais de membrana de diferentes classes de seres vivos. Adaptado a partir de Brown (1998)⁸

1.3. A biossíntese do ergosterol

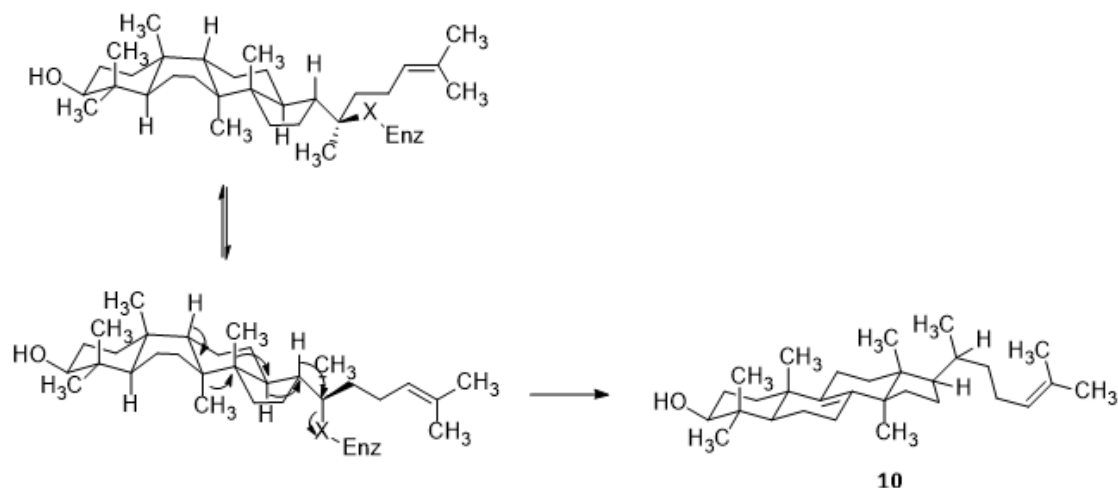
A biossíntese do ergosterol (9, **Esquema 2**) tem início a partir do 2,3-óxido de esqualeno, que pela ação da enzima lanosterol sintase passa por uma sequência de ciclizações em cascata, formando um

carbocátion terciário estabilizado, denominado cátion protosterol, (15) (**Esquema 3**).

O cátion protosterol é convertido em lanosterol (10, **Esquema 4**), quando os anéis assumem conformações adequadas (cadeira-bote-cadeira-bote).¹⁰



Esquema 3. Formação do cátion protosterol a partir da ciclização em cascata do 2,3-óxido de esqualeno. Adaptada de Hess-Jr, 2013⁹



Esquema 4. Equilíbrio conformacional do aduto protosterol/lanosterolsintase para formação do lanosterol (**10**)

Em seguida, o lanosterol (**10**) sofre uma desmetilação no carbono da posição 14, formando uma insaturação, pela ação da lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51) (**Esquema 5**). O intermediário 4,4-dimetilcolesta-8,14,24-trienol formado é

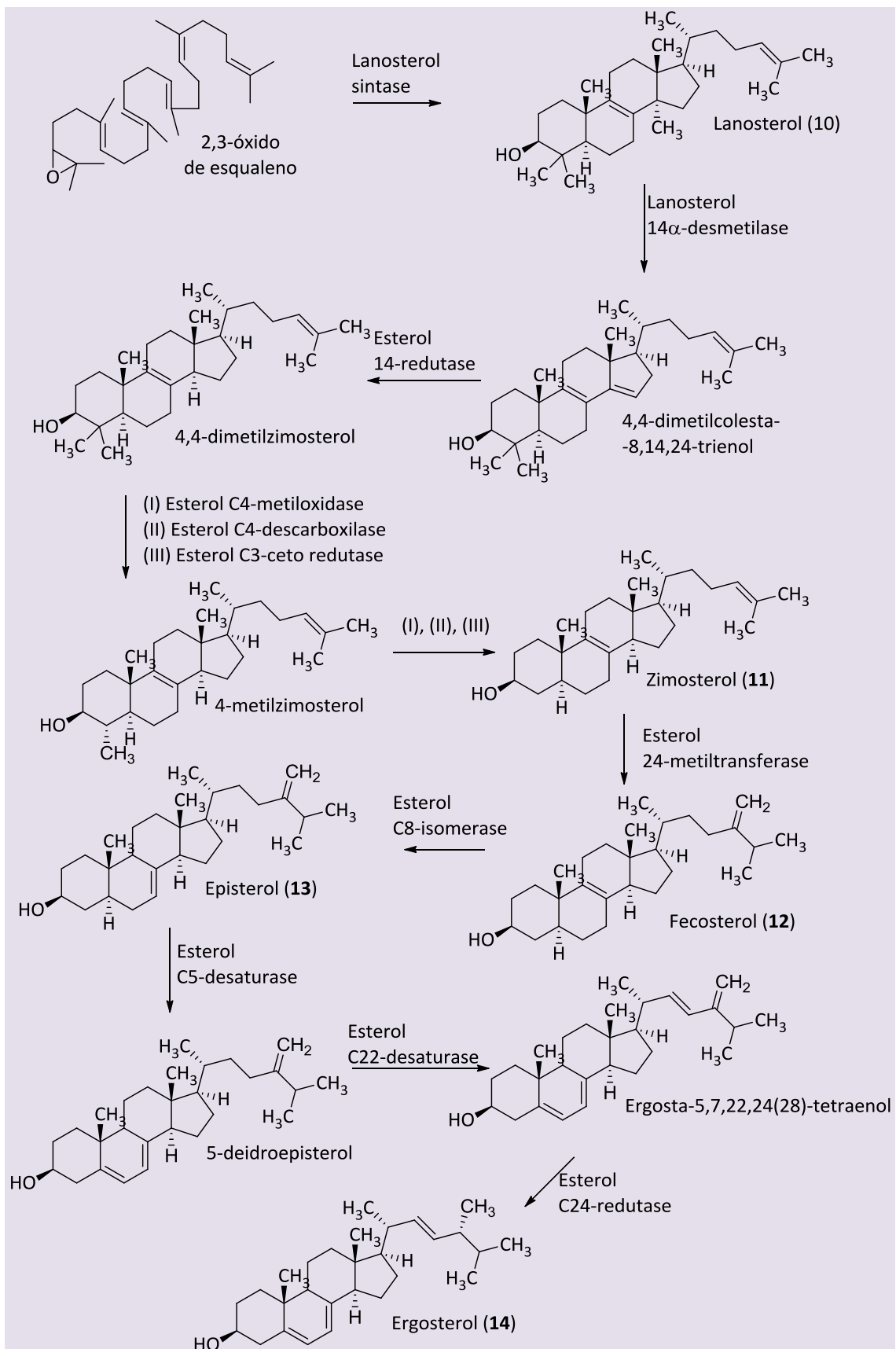
reduzido pela ação da esterol 14-redutase e o produto da reação sofre então duas desmetilações consecutivas na posição 4, através da ação de três enzimas. Inicialmente, a primeira metila é oxidada ao carboxilato correspondente. Em seguida,

ocorre uma descarboxilação que forma um enol na posição 3, que é prontamente convertido na cetona correspondente (tautômero mais estável). A cetona é reduzida de forma enantiosseletiva pela ação da esterol C3-ceto-redutase e o processo é repetido na segunda metila (também na posição 4), podendo-se então inferir que os dois processos de desmetilação (posição 14 e posição 4) possuem mecanismos distintos. O produto destas reações é o zimosterol (**11**), que após uma série de modificações, tanto no esqueleto ciclopentanoperidrofenantreno quanto na cadeia 2-metil-2-hepten-2-il na posição 17, é convertido finalmente em ergosterol (**9**, Esquema 5).¹¹

1.4. A identificação da Lanosterol 14 α -desmetilase

A remoção da metila na posição 14 do lanosterol (**10**) já era descrita na literatura,¹² mas a elucidação do tipo de oxidação que ocorria foi comunicada em 1972, quando Alexander e colaboradores definiram, através de marcação isotópica com ¹⁴C, que o carbono da posição 14 do lanosterol era removido sob a forma de ácido fórmico, divergindo do que ocorre com as metilas em C4, que saíam sob a forma de CO₂, após duas descarboxilações consecutivas.¹³ Os experimentos anteriores foram realizados utilizando a fração microsomal de *Saccharomyces cerevisiae*, mas o trabalho de Mitropoulos, publicado em 1976, demonstrou a similaridade existente entre os

sistemas microsomais de *S. cerevisiae* e fígado de rato. Esse experimento mostra que a desmetilação do lanosterol ocorre por ação do sistema microsomal P-450, que contém metaloenzimas com o grupo heme, haja vista que a adição de CO impede a retirada da metila na posição 14.¹⁴ Dessa forma, percebeu-se que a desmetilação do lanosterol é uma etapa comum aos fungos e aos mamíferos na biossíntese de seus lipídios de membrana, ergosterol (**9**) e colesterol (**7**), respectivamente. As reações de desmetilação do lanosterol (metilas em C4 e metila em C14) foram atribuídas a diferentes enzimas, e a ideia de que uma delas seria responsável pela desmetilação oxidativa no carbono 4 foi a primeira menção à atividade enzimática da lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51).¹⁵ A estrutura primária da CYP51 foi elucidada por Kalb e colaboradores,¹⁶ através a análise do gene responsável pela codificação da enzima, e esse isolamento permitiu que Yoshida e Aoyama¹⁷ realizassem experimentos que sugeriram o primeiro modelo de mecanismo de ação de antifúngicos azólicos sobre a 14 α -desmetilase, que até então era chamada de fração do citocromo P-450 capaz de realizar desmetilação (P-450_{14DM}). Os autores evidenciaram a formação de complexos de *spin* baixo do ligante heterocíclico (antifúngicos azólicos) com o ferro do centro heme da enzima, através da mudança do máximo de absorção nos espectros de ultravioleta, que levaram as autoras a formularem uma proposta do modelo de ligação dos compostos azólicos com o centro heme do citocromo P-450 (Figura 2).



Esquema 5. Biossíntese do Ergosterol (9) em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), a partir do óxido de esqualeno¹¹

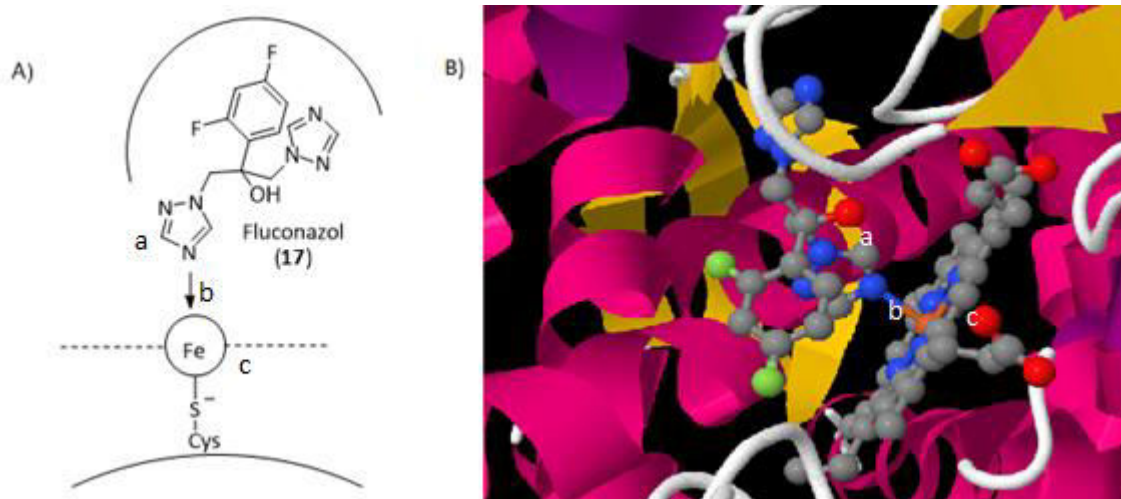


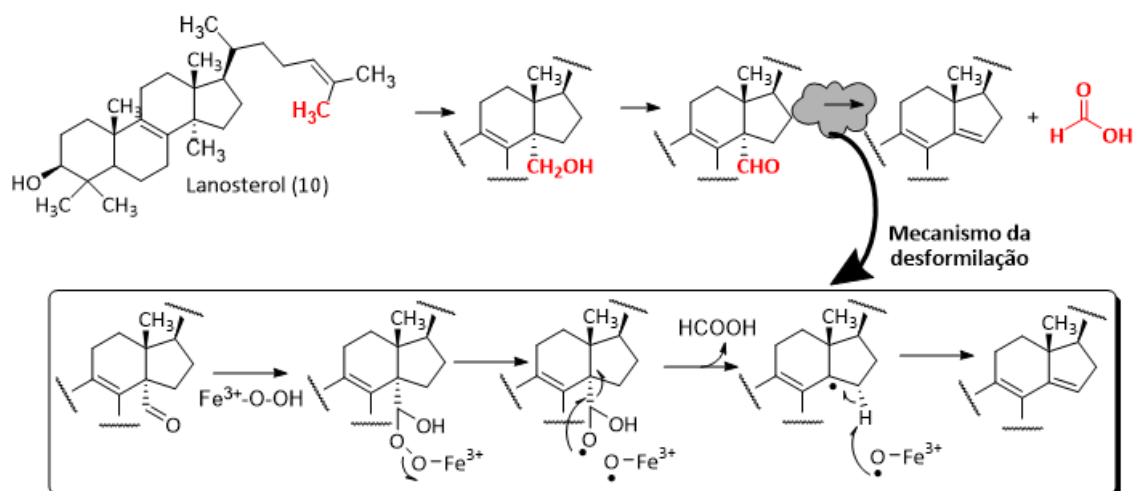
Figura 2. A) Proposta uma possível interação de um antifúngico azólico, fluconazol (**17**), com o P-450_{14DM} na hipótese original de Yoshida e Aoyama;¹⁷ B) Estrutura cristalográfica de CYP-51 de *Mycobacterium tuberculosis* cocrystalizada com fluconazol (**17**) depositada no *Protein Data Bank* sob o código 1EA1.¹⁸ a) heterociclo triazólico; b) ligação coordenada do nitrogênio do núcleo azólico com o ferro; c) átomo de ferro do núcleo porfirínico

Neste contexto, a fração microsomal denominada citocromo P450 passou a ser compreendida como um conjunto de enzimas que realizam reações de natureza semelhante sobre substratos diferentes. Aquelas que realizam a desmetilação do lanosterol, em diferentes organismos, foram então agrupadas em uma família denominada CYP51, que envolve as diferentes isoformas de lanosterol 14 α -desmetilase, presentes em diferentes indivíduos.⁴ A análise da família CYP51 mostrou que exemplares destas enzimas encontram-se em uma grande diversidade de organismos, de mamíferos a fungos (sendo a única família com esta abrangência dentre todas contidas no citocromo P450), o que mostra que o conjunto de genes associados às enzimas da família CYP51 é evolutivamente bastante antigo. Em contrapartida, o processo evolutivo fez com que estas isoformas se modificassem nas diferentes classes de organismos, gerando enzimas com baixa identidade sequencial (aproximadamente 30%).¹⁹ Desta maneira, é razoável imaginar a CYP51 como um alvo promissor na quimioterapia antiparasitária, permitindo assim o planejamento de inibidores que sejam ativos unicamente nas isoformas presentes nos micro-organismos

causadores de doenças (fungos ou protozoários).

1.5. O mecanismo de desmetilação catalisada pela CYP51 (lanosterol 14 α -desmetilase)

Conforme verificado na rota biossintética do ergosterol (**9**) em fungos, os processos de desmetilação que ocorrem do lanosterol (**10**) ao ergosterol (**9**) são baseados em mecanismos distintos (**Esquema 6**). O mecanismo de desmetilação da posição 14 envolve inicialmente a monooxigenação régio- e estereosseletiva da metila, seguida da oxidação do álcool ao aldeído correspondente. A conversão do intermediário carbonilado ao produto final insaturado se dá sem a necessidade de se formar um intermediário ácido carboxílico, devido à natureza radicalar do processo. O ferro do grupo heme porfirínico promove uma série de oxidações radiculares, que culminam na saída de ácido fórmico (e não de CO₂, como nas descarboxilações das metilas da posição 4) e posterior formação da ligação dupla.²⁰



Esquema 6. Sequência de reações oxidativas catalisadas pela CYP51 e proposta de mecanismo para a conversão do aldeído β,γ -insaturado no dieno correspondente. Adaptado de Shyadehi e colaboradores, 1996²⁰

2. CYP51 no desenvolvimento de fungicidas

As infecções fúngicas ganharam destaque durante as últimas duas décadas, devido a serem uma das principais causas de morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, tais como pacientes submetidos a quimioterapia antineoplásica ou a transplantes de órgãos, ou ainda a pacientes com AIDS. Estima-se que com o fenômeno de aquecimento global, novas espécies de fungos, submetidas ao estresse

térmico adaptativo, possam se tornar patogênicas para mamíferos.²¹

Dados epidemiológicos dos Estados Unidos, referentes ao período de 1979 a 2000 (**Figura 3**), evidenciam que a ocorrência de casos sepse por ano aumentou durante esse período de 82 casos por 100.000 pacientes para 240 casos por 100.000 pacientes. Pela análise dos dados, levando-se em conta o agente etiológico, nota-se que os casos de sepse causados por fungos apresentaram um incremento de 207% em 20 anos, passando de um total de 5231 casos em 1979 para 16.042 casos em 2000.²²

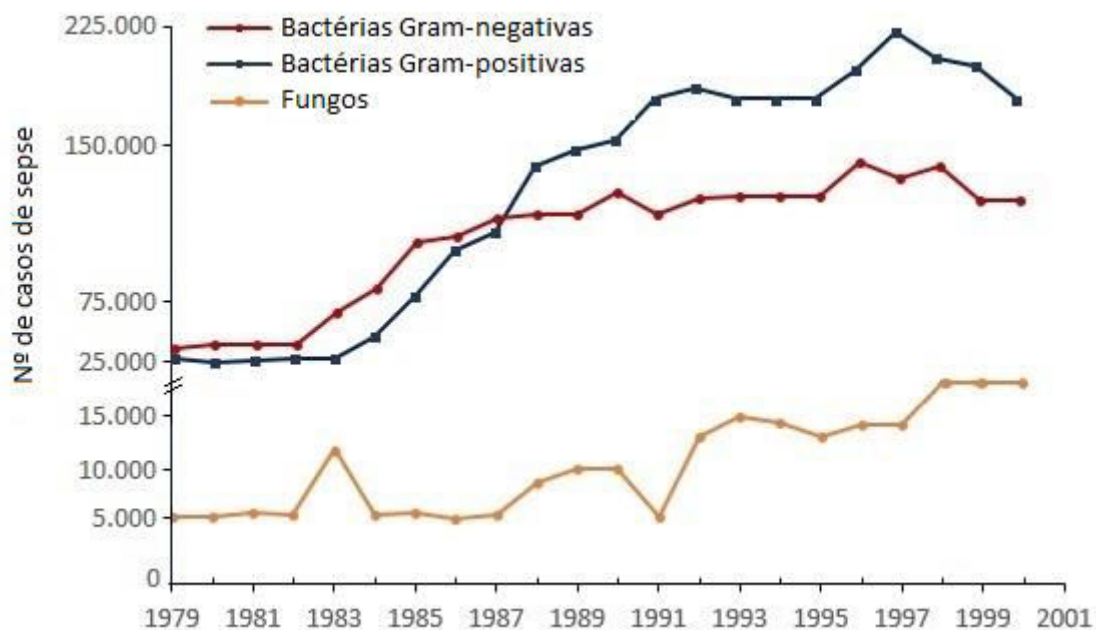


Figura 3. Número de casos de sepse nos Estados Unidos, de acordo com o agente etiológico 1979-2000²²

2.1. Fármacos antifúngicos inibidores da CYP51

Clinicamente, candidíase, aspergilose e criptococose são as três principais infecções fúngicas que acometem pacientes imunossuprimidos.²³ Atualmente, os agentes antifúngicos mais utilizados no tratamento destas infecções (**Figura 4**) pertencem a classe dos azóis, principalmente os que possuem núcleos heterocíclicos imidazólicos ou triazólicos, como o fluconazol (**17**), cetoconazol (**18**) e itraconazol (**19**). Destacam-se também os polienos macrocíclicos, como a anfotericina B (**20**); as equinocandinas, como caspofungina (**21**); e as alilaminas, como a terbinafina (**22**).

As diversas classes de antifúngicos atuam

através de diferentes mecanismos de ação, tendo como consequência de sua utilização o comprometimento da membrana e, conseqüentemente, a lise celular (fungicidas) ou interrupção dos processos de divisão celular (fungistáticos). A terbinafina (**22**, **Figura 4**) é veiculada sob a forma do cloridrato correspondente e atua inibindo a enzima esqualeno epoxidase de diversos fungos que causam dermatofitoses. Esta alilamina impede a formação do 2,3-óxido de esqualeno e conseqüentemente, todas as demais conversões até o lanosterol (**10**), comprometendo toda a biossíntese dos lipídeos de membrana derivados desta via, inclusive do ergosterol (**9**). Desta forma, a permeabilidade seletiva da célula do fungo fica comprometida, sofrendo o processo de lise.²⁴

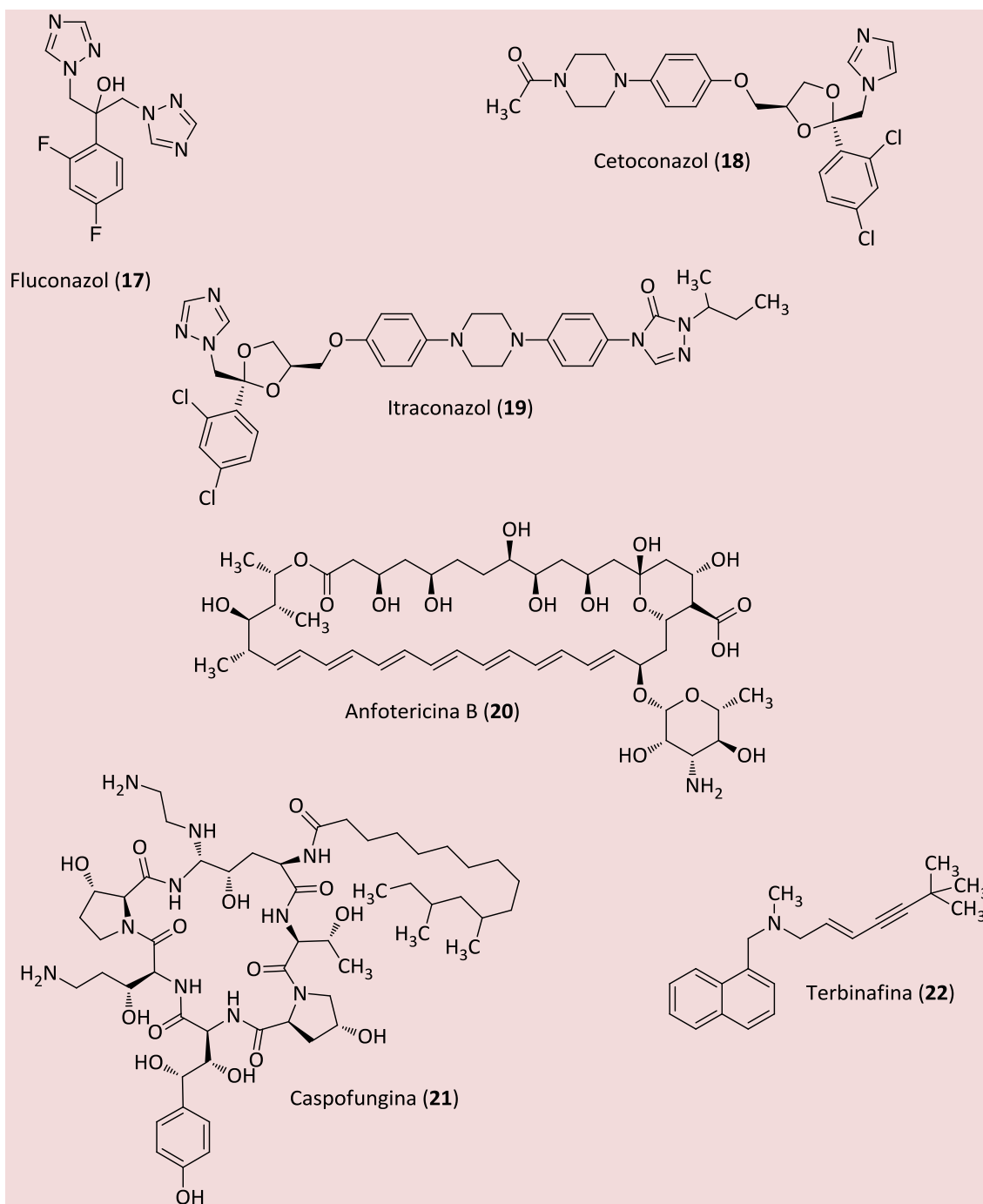


Figura 4. Estrutura de fármacos representativos das principais classes de antifúngicos

Os polienos tem como exemplo conspícuo a anfotericina B (**20**, **Figura 4**), um fármaco clinicamente explorado há pelo menos 50 anos. Diferente dos demais antifúngicos, a anfotericina B não atua na via biossintética do ergosterol (**9**). Experimentos recentes, utilizando a técnica de Ressonância Magnética Nuclear no Estado Sólido (SSNMR) mostraram que a anfotericina B atua através

da formação de agregados lipídicos no lado externo da membrana da célula do fungo. Esses agregados possuem alta afinidade pelo ergosterol (esteroide extremamente lipofílico), então este é extraído da estrutura da membrana e acondicionado em agregados de anfotericina B, uma estrutura supramolecular que funciona como uma “esponja de lipídeos”.²⁵ Desta maneira, há a

diminuição na concentração de ergosterol na membrana do fungo, com conseqüente alteração no funcionamento da mesma. No entanto, a utilização de anfotericina B (**20**) tem sido ponderada, por sua toxicidade para o hospedeiro, provavelmente devido a efeitos sobre membranas de células contendo colesterol.^{26,27} Dentre as novas classes de antifúngicos que surgiram nas últimas décadas, a única que alcançou as etapas de triagens clínicas foi a classe das equinocandinas (caspofungina **21**, **Figura 4**). As equinocandinas agem pelo bloqueio da síntese da parede celular, através da inibição da β -(1,3)-glucano-sintase, possuindo perfis de segurança favoráveis. Além de um amplo espectro de atividade, as equinocandinas possuem expressivo efeito antifúngico, principalmente se administradas em associação com inibidores da biossíntese de ergosterol.²⁸

Os derivados azólicos são amplamente utilizados em quimioterapia antifúngica. Destacam-se o fluconazol (**17**), cetoconazol

(**18**) e itraconazol (**19**) (**Figura 4**). Estes compõem a classe mais popular de antifúngicos, e atuam inibindo a CYP51, possuindo uma grande segurança terapêutica devido à alta tolerância do organismo hospedeiro à sua ingestão. Na **Figura 5** apresentamos uma representação esquemática do mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos, evidenciando o ponto de interferência destes derivados na cascata de eventos bioquímicos que culminam com a biossíntese do ergosterol. Com a inibição da 14α -desmetilase, o precursor (lanosterol, no caso da maioria dos fungos) é acumulado, sofrendo posteriormente a ação da Δ -5,6-desaturase (codificada pelo gene Erg3), gerando o esteroide 14α -metil-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol, que é um esteroide tóxico para a célula, pois sua incorporação na membrana celular culmina com a desorganização da mesma, levando a alterações em sua fluidez, permeabilidade e integridade.^{29,30}

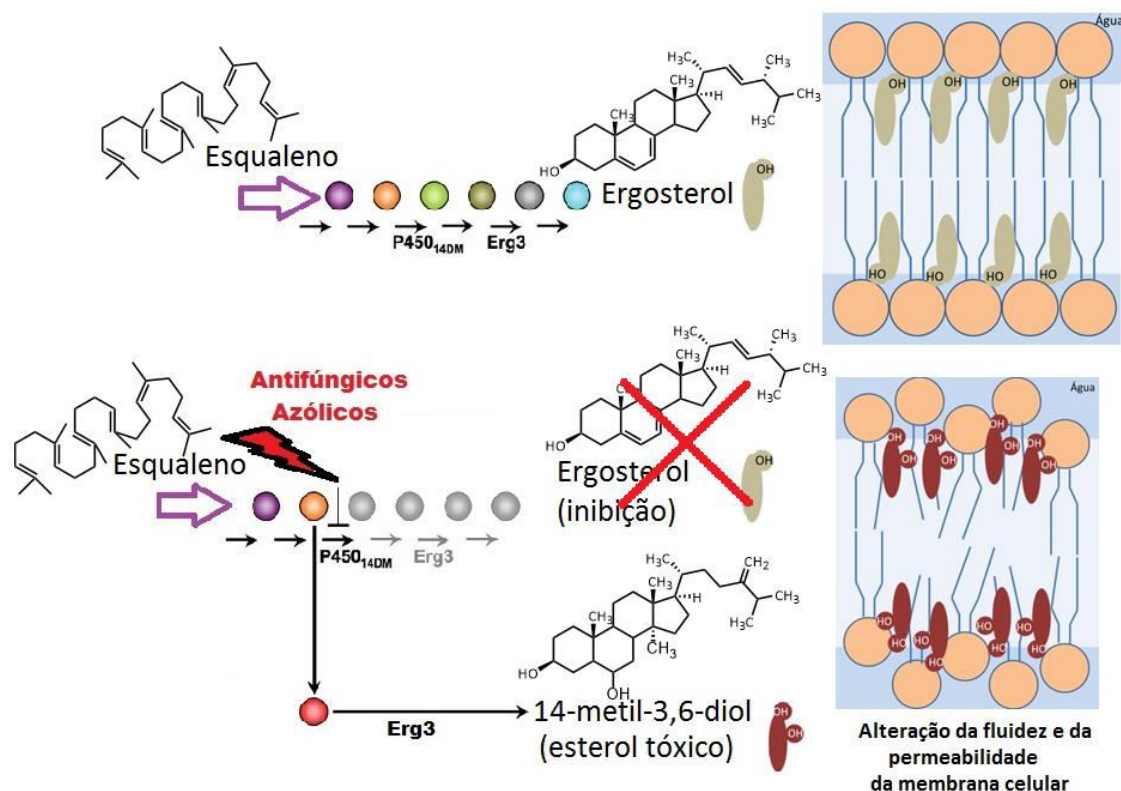


Figura 5. Representação esquemática do mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos sobre a síntese de ergosterol e subsequente alteração da composição e da organização da membrana celular (Adaptado de Shapiro, 2011 e Abe, 2009)^{29,30}

Esta classe terapêutica abriu excelentes perspectivas para o tratamento de infecções fúngicas tópicas e sistêmicas. Entretanto, o surgimento de mecanismos de resistência, além da baixa biodisponibilidade causada principalmente pela reduzida absorção por via oral de muitos destes compostos, levou a busca por novos azóis, surgindo uma segunda geração de derivados azólicos com melhores perfis, como: voriconazol (**23**), posaconazol (**24**), ravuconazol (**25**) e albaconazol (**26**)

(**Figura 6**), que são comercializados ou, atualmente, encontram-se nos estágios finais de testes clínicos. Estes azóis possuem largo espectro antifúngico, baixa toxicidade e melhor perfil farmacocinético. Além disso, a maioria dos agentes antifúngicos, atualmente em uso clínico, agem como fungistáticos ao invés de fungicidas, sendo este fato uma grande limitação por favorecer o surgimento de cepas resistentes.

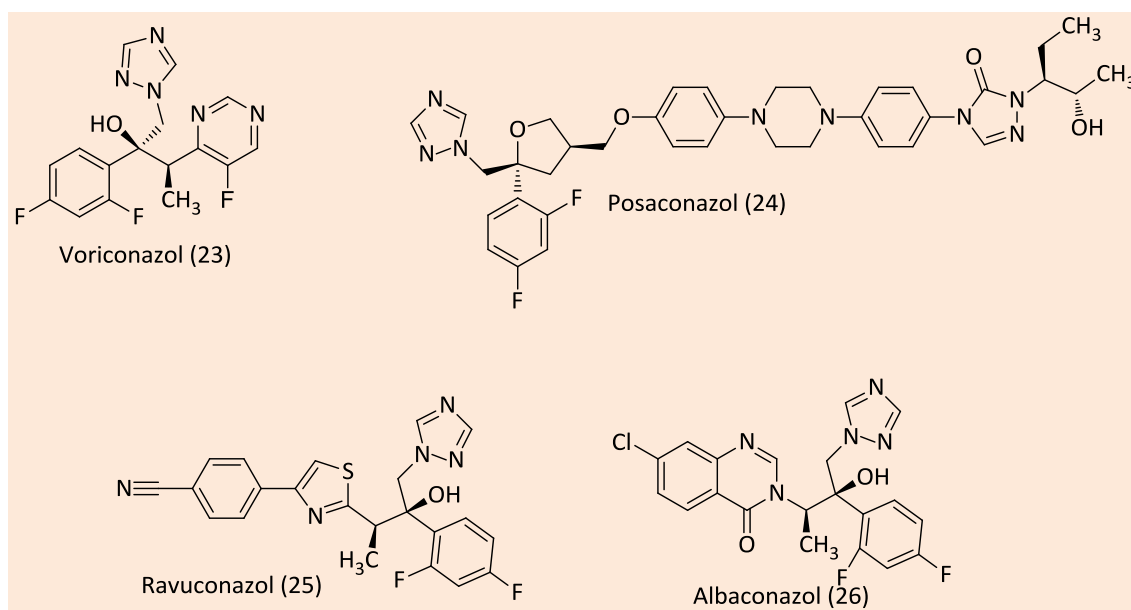


Figura 6. Estrutura de antifúngicos azólicos de segunda geração

O mecanismo de desenvolvimento de resistência de micro-organismos a agentes quimioterápicos está normalmente relacionado a fatores que impedem a entrada do fármaco na célula ou ainda a presença de estruturas que removem o fármaco do seu interior. Outros mecanismos de resistência também podem se estabelecer através de processos bioquímicos de inativação do fármaco, ou ainda por variações genéticas no patógeno, que podem provocar alterações estruturais no alvo, que vão interferir negativamente na afinidade do fármaco ao seu receptor.³¹ A resistência pode surgir pela ação de cada um desses fatores isoladamente ou ainda por combinações dos mesmos. Em fungos, os mecanismos de resistência mais comuns envolvem mutações nos genes que

codificam as proteínas alvo, ou ainda o aumento na expressão de bombas de efluxo. Outro mecanismo comum envolve o aumento da expressão das enzimas alvo, alterando a razão estequiométrica entre o alvo bioquímico e seu inibidor, favorecendo o fungo.³¹ O fato é que as infecções fúngicas tem se tornado cada vez mais difíceis de serem tratadas, apresentando taxas crescentes de mortalidade e elevados custos para o sistema de saúde.^{31,32}

2.2. Novos antifúngicos azólicos

Na busca por novos fármacos aplicáveis ao tratamento de infecções fúngicas, Che e

colaboradores construíram modelos tridimensionais (3D) da CYP51 de *Candida albicans* (CACYP51) e *Aspergillus fumigatus* (AFCYP51), através da modelagem molecular comparativa,^{33,34} baseada nas coordenadas do cristal da CYP51 de *Mycobacterium*

tuberculosis (MTCYP51).¹⁸ Estes pesquisadores sintetizaram uma nova série de azóis substituídos (**Figura 7**), com base no sítio ativo da CACYP51 e analisaram a relação estrutura-atividade (REA) destes compostos por ancoramento molecular.

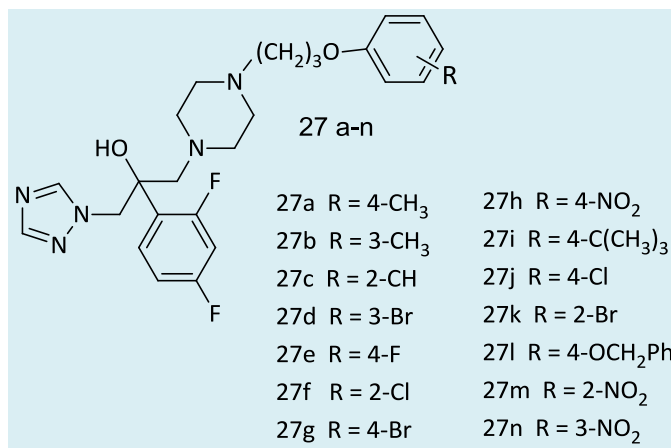


Figura 7. Estrutura de compostos azólicos com potencial atividade antifúngica, sintetizados por Chee colaboradores³⁵

Os compostos sintetizados (**Figura 7**) apresentaram atividade de moderada a excelente contra todas as espécies de fungos testadas *in vitro* (*Candida sp.* e *Cryptococcus neoformans*). A maioria dos compostos azólicos demonstrou boa atividade inibitória, com destaque para o composto **27i**, que apresentou elevada atividade, com largo espectro antifúngico, sendo considerado como um bom candidato para avaliações e otimizações posteriores.³⁵

Um trabalho recente, realizado por

Babazadeh-Qazijahani e colaboradores,³⁶ descreveu a preparação de novos antifúngicos azólicos do tipo éteres de oxima com esqueleto do tipo imidazolilcromanona, análogos do omoconazol (**28**, **Figura 8**).³⁷ O omoconazol (**28**) e a maioria dos antifúngicos imidazólicos contêm cadeias laterais de éter benzílico (**29a-f**), sendo assim foram realizadas modificações moleculares, aplicando a estratégia de fechamento de anéis, aumentando a rigidez conformacional da estrutura.

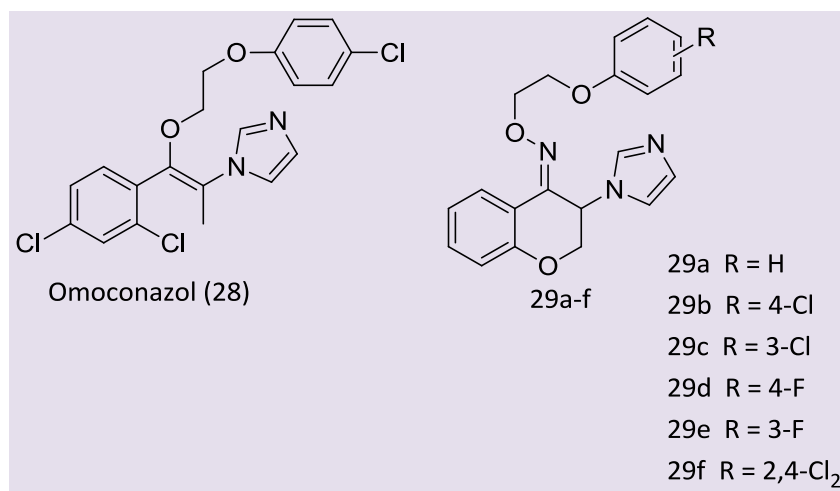


Figura 8. Estrutura do fungicida omoconazol e seus análogos, do tipo imidazolilcromanonas, sintetizados por Babazadeh-Qazijahani e colaboradores³⁶

Os compostos **29a-f** foram inativos contra *C. albicans* com CMI > 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, todos os derivados exibiram elevada atividade contra *C. gattii*, com valores de CMI na faixa de 0,5 a 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, evidenciando a variação de potência destes novos derivados em função da natureza do fungo. O derivado azólico **29c** foi o que apresentou maior atividade. Todos os compostos apresentaram atividade contra *A. fumigatus* e *E. dermatidis*. Foi realizado também um estudo preliminar, através modelagem molecular, a fim de prever como os novos compostos sintetizados poderiam interagir com a CYP51 de *Cryptococcus neoformans*.

O interesse na investigação de novas alternativas para tratamento de infecções fúngicas tem buscado ainda o estudo de associações de agentes antifúngicos azólicos com outros medicamentos, a fim de melhorar a eficácia e/ou diminuir a toxicidade de compostos azólicos.³⁵⁻³⁷ Cabral e colaboradores investigaram a associação entre azóis e estatinas, considerando a vantagem do sinergismo entre estas classes, devido à baixa toxicidade e hidrofobicidade das estatinas para seres humanos, em comparação com os fármacos do tipo azólicos.³⁸ As estatinas agem como inibidores competitivos da 3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima-chave que catalisa a biossíntese de

mevalonato,³⁹ enquanto os azóis estão relacionados com a inibição da CYP51.⁴⁰ Embora ajam por mecanismos diferentes, ambos interferem na biossíntese de esteróis. Neste trabalho foi avaliada a atividade *in vitro* de cinco azóis (clotrimazol, fluconazol, itraconazol, cetoconazol e miconazol) e cinco estatinas (atorvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina), isolados ou em associações, testados contra leveduras de *S. cerevisiae* e *C. utilis* por meios de bioensaio de difusão em ágar, a fim de detectar possíveis efeitos sinérgicos e identificar as associações mais promissoras. Foi observado que azóis aplicados em associações com atorvastatina, lovastatina, rosuvastatina e sinvastatina, apresentaram halos de inibição aumentados, em comparação com o efeito do tratamento com o azol isoladamente. Estes efeitos foram confirmados por avaliação quantitativa e qualitativa de esteróis. A possibilidade de avaliar os efeitos combinados de antifúngicos azólicos e estatinas pode ser considerada como perspectiva para tratamentos alternativos, tanto em infecções fúngicas quanto em infecções causadas por protozoários.

3. CYP51 no desenvolvimento de substâncias tripanocidas

Nas últimas décadas, a pesquisa em relação à síntese de novas moléculas para o tratamento da doença de Chagas (DC) vem sendo beneficiada pela descoberta de novos alvos em *Trypanosoma cruzi*, como o sequenciamento dos genomas, que contribuiu para identificação de diversos genes onde muitos deles estão presentes apenas nas células do parasita e não no homem.⁴¹ Desta forma, a identificação de vários alvos biológicos promissores neste parasito, sendo a maioria enzimas, foi favorecida pelo sequenciamento do genoma do *T. cruzi*.

Dentre os alvos macromoleculares mais explorados estão as proteases (cisteíno proteases, serino proteases, metaloproteínas e treonino proteases) que são de fundamental importância para o ciclo de vida do parasito. Este alvo participa de diferentes etapas do ciclo de desenvolvimento do *T. cruzi* e é de fundamental importância para a colonização do hospedeiro, estando envolvido desde o mecanismo de invasão do

tecido conjuntivo até o escape da resposta imune.⁴²⁻⁴⁴ Um alvo bioquímico que tem sido amplamente estudado na quimioterapia da DC é a cruzaina ou cruzipaína, que constitui-se na principal cisteíno protease de *T. cruzi*, expressa em todos os estágios do ciclo de vida e possuindo várias funções de grande relevância para o sobrevivência do parasito. Esta enzima vem impulsionando a descoberta de vários inibidores potentes e seletivos contra o *T. cruzi*. Dentre as classes de inibidores estão os derivados não peptídicos como as pirimidinas, tiossemicarbonas e chalconas.⁴¹⁻⁴³ Outros alvos promissores na quimioterapia de Chagas, também identificados pelo sequenciamento do genoma no parasito, são a via glicolítica, o metabolismo dependente de grupos tióis, a transferência de ácido siálico e as DNA topoisomerases.⁴⁴

A biossíntese de esteróis (**Figura 2**) é outro alvo de grande importância e que vem sendo explorado no desenvolvimento de novos fármacos, visto que os inibidores da biossíntese de esteroides foram os únicos que conseguiram chegar a triagens clínicas avançadas como candidatos a fármacos anti-chagásicos, após os fármacos benznidazol (**30**) e nifurtimox (**31**) (**Figura 9**).

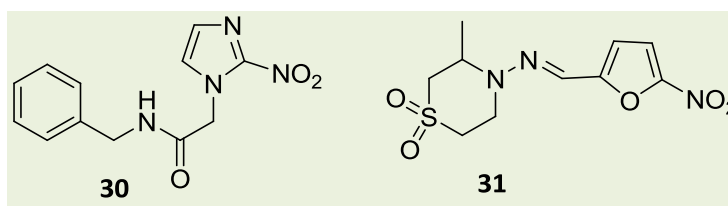


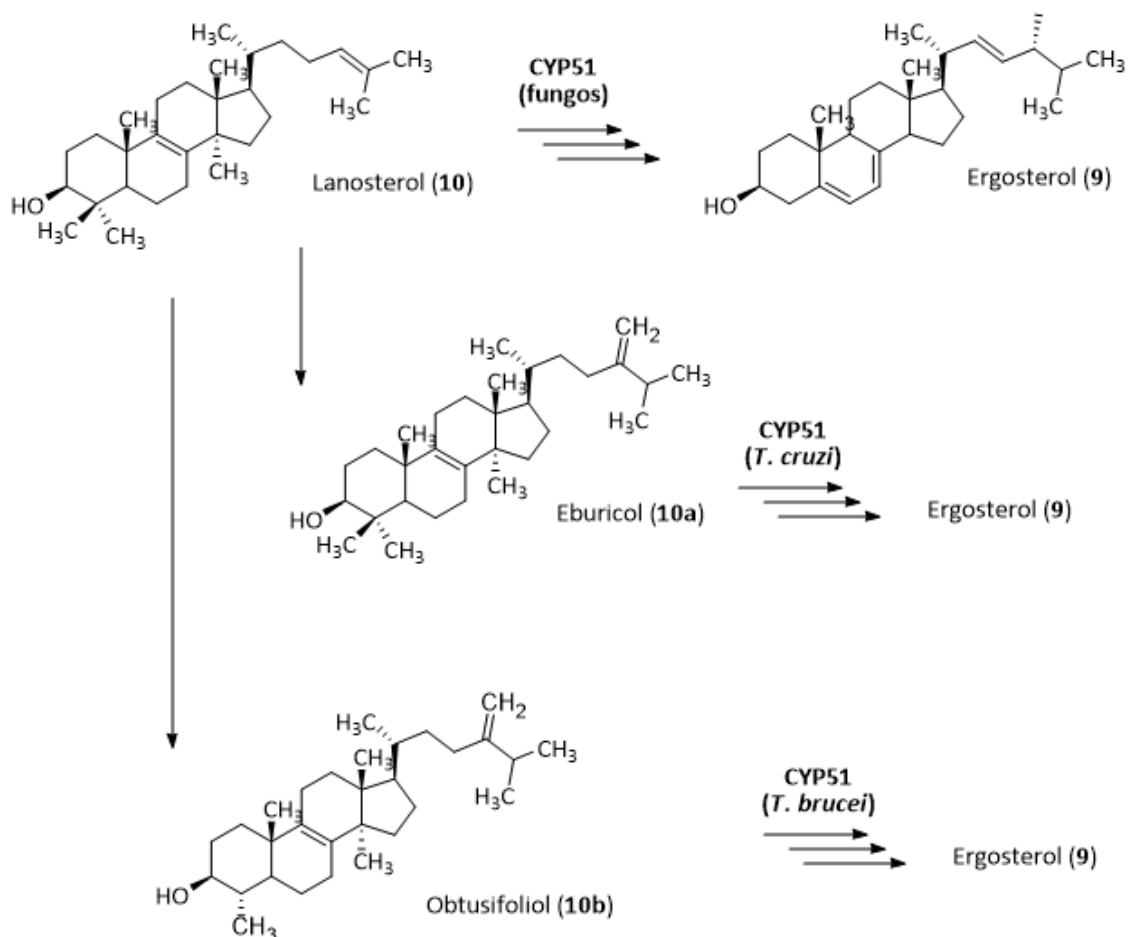
Figura 9. Fármacos com atividade tripanocida, benznidazol (**30**) e nifurtimox (**31**)

No *T. cruzi*, os esteroides endógenos possuem função direta na viabilidade celular e na regulação da atividade de enzimas de membrana.⁴⁵ Apesar de o ergosterol ser um produto final, comum às vias biossintéticas tanto de tripanossomatídeos quanto de fungos, existem peculiaridades no que tange à síntese desse lipídeo, principalmente na etapa de desmetilação mediada pela CYP51 de cada espécie. Apesar da baixa similaridade entre as isoformas de CYP51 nos

diferentes Reinos, entre 22 e 33% na sequência primária de aminoácidos,¹⁹ todas as enzimas possuem elevadas região- e estereosseletividades nas reações que catalisam, o que diminui muito o número de substratos possíveis. Até o momento, são conhecidos apenas três substratos para todas as famílias de esteroil-14 α -desmetilases, sendo todos 14-metil-esteroides pós-esqualeno na via de biossíntese, por exemplo: lanosterol (**10**), eburicol (**10a**) e

obtusifoliol (**10b**).⁴⁶ Este fenômeno, entretanto, faz com que não seja possível extrapolar as propriedades de um antifúngico azólico capaz de inibir a CYP51 de um fungo

para a CYP51 de um tripanossimatídeo, já que cada uma delas tem afinidades diferenciadas, por substratos distintos (**Esquema 7**).



Esquema 7. Substratos preferenciais de CYP51 de fungos (**10**), *T. cruzi* (**10a**) e *T. brucei* (**10b**)

A utilização de inibidores de CYP51 com atividade tripanocida aconteceu antes da elucidação desta enzima como um alvo potencial. Antifúngicos como itraconazol e cetoconazol foram testados *in vitro* e *in vivo* em modelos de Chagas ainda na década de 80, com diminuição da carga parasitária nos animais infectados.^{47,48} A utilização desses antifúngicos teve início no trabalho de McCabe e colaboradores,⁴⁹ que utilizou o cetoconazol (**18**) em um modelo murino de infecção por *T. cruzi*, devido ao fato de relatos prévios da atividade deste azol contra *Plasmodium falciparum*⁵⁰ e *Leishmania tropica*.⁵¹ Ainda assim, entre os compostos

que mais se destacam como inibidores da biossíntese do ergosterol, com potencial aplicação no tratamento de pacientes chagásicos, estão os fungicidas azólicos, inibidores da CYP51. Com o desenvolvimento de novos derivados azólicos da classe dos triazóis, indicados na **Figura 10**, pode-se constatar a eficácia e a atividade tripanocida desses compostos sobre alvos específicos do metabolismo do ergosterol. Estes compostos triazólicos agem sobre a CYP51 do *T. cruzi*, impossibilitando a formação do intermediário zimosterol a partir do lanosterol, impedindo assim a formação do ergosterol.^{45,52} Desta forma, o resultado da inibição nas etapas

finais da biossíntese do ergosterol é o acúmulo de precursores biossintéticos na membrana celular do *T. cruzi*, comprometendo sua integridade, de forma similar ao que acontece nos fungos (Figura 5). Devido a isso, a etapa de biossíntese do

ergosterol é considerada um alvo bioquímico potencial também para a pesquisa de quimioterápicos para a DC, já que este esteroide é fundamental para a membrana celular dos tripanossomatídeos.

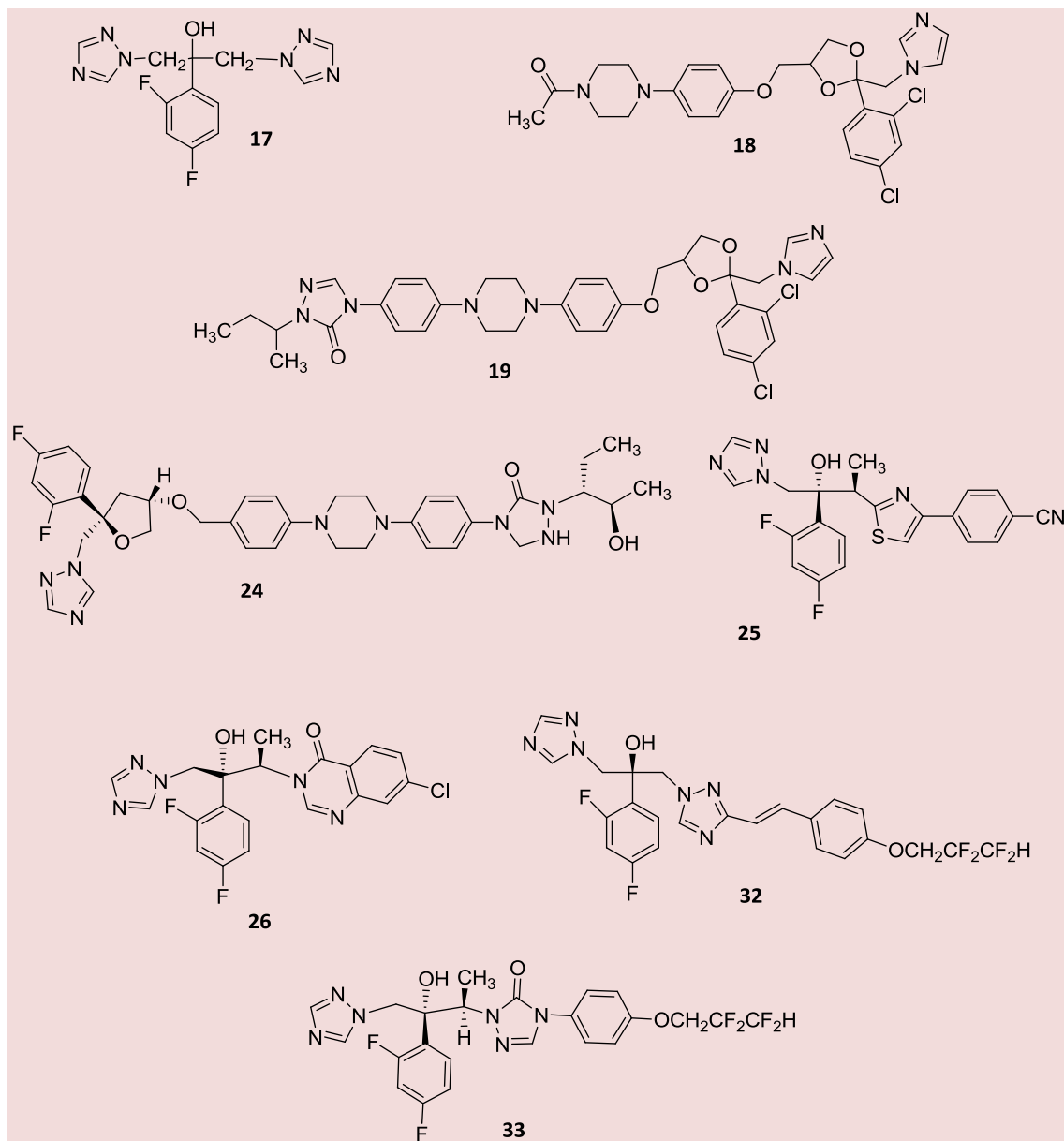


Figura 10. Compostos azólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, testados no tratamento experimental da DC

Como as células dos hospedeiros vertebrados são dependentes do colesterol e não do ergosterol, esta via bioquímica destaca-se como um alvo promissor para o tratamento da DC. Trabalhos descritos na

literatura demonstram que o protozoário *T. cruzi* é extremamente suscetível a diferentes inibidores da biossíntese de ergosterol, tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo*.⁵²⁻⁵⁴ Somado a isso, o gene da enzima C14 α -

desmetilase (Erg11) do parasito encontra-se ativado, tanto na forma evolutiva presente no mamífero quanto no inseto vetor, o que destaca ainda mais a importância deste alvo metabólico.⁵³

Os triazóis primeiramente avaliados, tanto experimental quanto clinicamente para o tratamento da DC, foram o fluconazol (17), o itraconazol (19) e o cetoconazol (18) (Figura

4), fármacos que possuem propriedades antifúngicas conhecidas. Contudo, apesar de serem ativos contra o parasito, nenhum deles apresentou resultados satisfatórios nos ensaios clínicos realizados.⁵⁴ Abaixo, encontra-se a estrutura cristalográfica da CYP51 do *Trypanosoma cruzi* com o fluconazol (17) ligado ao sítio catalítico da enzima (Figura 11).

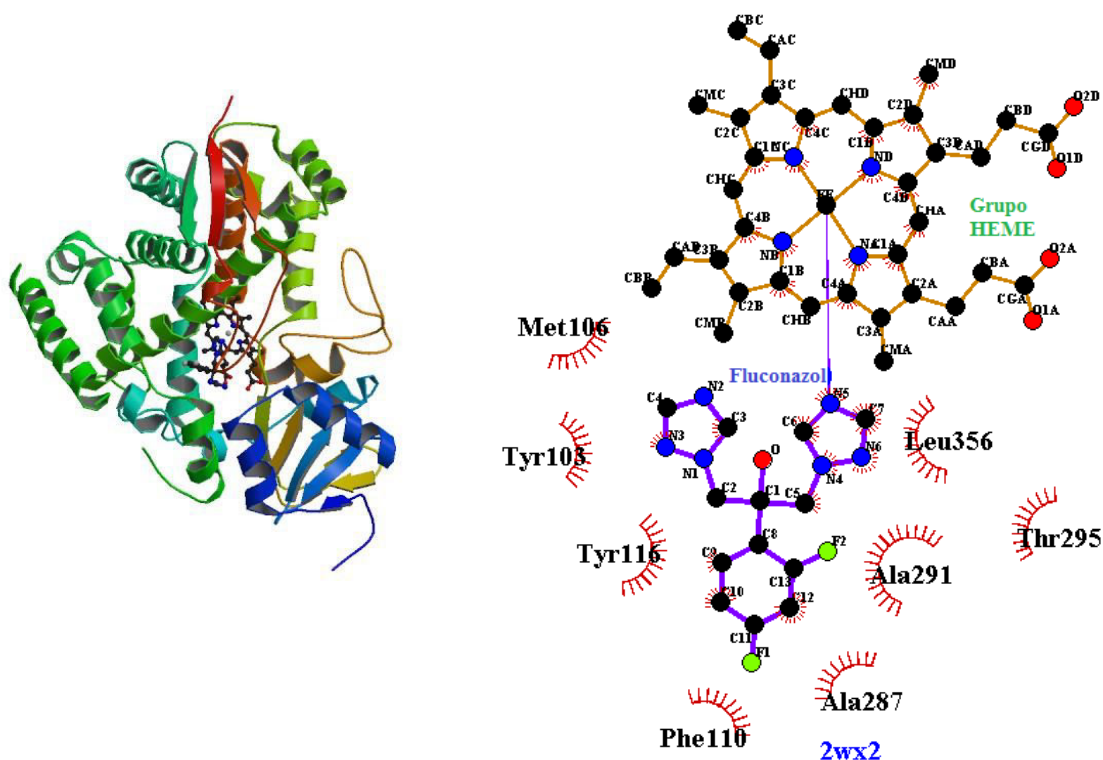


Figura 11. Estrutura cristalográfica da CYP51 do *Trypanosoma cruzi* com o fluconazol (17) ligado ao sítio catalítico da enzima, depositado no *Protein Data Bank* (PDB) sob o código 2WX2 (à esquerda). Esquema bidimensional de interação do fluconazol (17) com o sítio catalítico da enzima, gerado pelo programa LigPlot a partir do mesmo código (à direita)

Por outro lado, o tipifarnibe (34) (Figura 12), um inibidor da proteína humana farnesiltransferase, foi apresentado como um potente inibidor da CYP51 de *T. cruzi* ($DE_{50} = 4$ nM), diminuindo de forma expressiva o

crescimento do parasito, sendo considerado um protótipo promissor para o desenvolvimento de novos derivados ativos contra o *T. cruzi*.⁵⁵

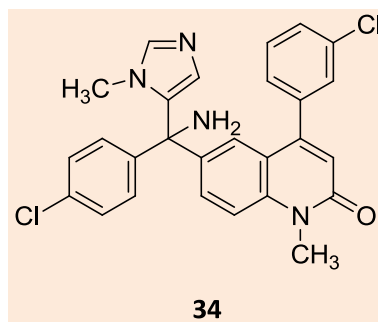


Figura 12. Inibidor azólico da farnesiltransferase, tipifarnibe (**34**)

Apesar dos antifúngicos azólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol, comercialmente disponíveis não serem potentes o suficiente para a erradicação do *T. cruzi* em modelos animais de infecção, ou mesmo em pacientes humanos,^{54,56} alguns derivados triazólicos, tais como o D0870 (**32**) (Zeneca) e o posaconazol (**24**, SCH 56592; Schering-Plough Research Institute) (**Figura 10**), foram selecionados para ensaios clínicos para o tratamento da DC. Estes triazóis agem como inibidores potentes da esterol C14 α -desmetilase, tanto de fungos quanto de protozoários, induzindo a cura parasitológica em testes com camundongos nas fases crônica e aguda da DC, sem apresentarem efeitos tóxicos às células hospedeiras.⁵⁶ Através de estudos complementares, ficou comprovado que a atividade anti-*T. cruzi* desses azóis deriva de suas propriedades farmacocinéticas, bem como de suas atividades tripanocidas potentes e seletivas frente às diferentes formas evolutivas do parasita. Estes triazóis possuem ampla capacidade de distribuição através de diferentes tecidos, além de longa meia-vida.^{57,58} Contudo, nas triagens clínicas para infecções fúngicas, o composto azólico (**32**) apresentou efeitos colaterais importantes, culminando com a sua interrupção.⁵⁹

Com base nos dados apresentados, Urbina e colaboradores estudaram a atividade do TAK-187 (**33**) (**Figura 10**), um triazol fungicida e inibidor da CYP51 com longa meia-vida contra o *T. cruzi* *in vitro* e em diversos modelos de infecção em animais. Os estudos *in vitro* revelaram que a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 0,3-1,0 μM

contra a forma epimastigota e de 1 nM contra a forma amastigosta. Estes pesquisadores também avaliaram o efeito do composto azólico (**33**) por um longo período de tratamento e observaram que quando **33** foi administrado em dias alternados em doses de 10-20 mg/kg em camundongos nas fases aguda e crônica da doença, levou a 80-100% de sobrevivência com 80-100% de cura parasitológica, em ambas as fases.⁵³ Este grupo também demonstrou que não foram observados efeitos secundários tóxicos em nenhum dos protocolos experimentais, qualificando o TAK-187 (**33**) para estudos avançados para o tratamento da DC.⁶¹

Dentre os inibidores da biossíntese de ergosterol, o composto triazólico albaconazol (UR-9825) (**26**) foi um dos mais potentes inibidores da CYP51 do *T. cruzi*, sendo confirmado por cromatografia gasosa de alta resolução acoplado a espectrometria de massas através da observação da diminuição dos esteróis endógenos do tipo 4,14-desmetil e o acúmulo de esteróis metilados em extratos apolares, obtidos a partir de *pellets* de células do parasita. Os resultados revelaram a alta atividade do composto contra a forma epimastigota com CIM de 30 nM, 33 vezes menor do que o composto referência, o cetoconazol (**18**). Já para a forma amastigota, o UR-9825 se mostrou mais ativo com CIM de 10 nM.⁵⁷ Seguindo essa mesma linha de pesquisa, Guedes e colaboradores comprovaram a atividade tripanocida *in vivo* do UR-9825 (**26**) como também a sua baixa toxicidade frente às células de hospedeiros. Estes pesquisadores testaram este composto contra duas cepas

do parasita, Y e Berenice-78, usando cachorros como hospedeiros, e observaram cura parasitológica de 25 e 100% em animais tratados com 1,5 mg/Kg/dia de albaconazol (**26**) por 60 e 90 dias, respectivamente, para cepa Y o mesmo não ocorreu para a cepa Berenice-78. Esses resultados mostraram o UR-9825 (**26**) como um potente candidato para o tratamento da DC.⁶⁰

Outro derivado triazólico revelado como um potente candidato anti-*T. cruzi* para triagens clínicas foi o ravuconazol (**25**, **Figura 10**), com elevada atividade *in vitro* e *in vivo*.⁵⁴ Apesar do grande interesse na pesquisa em torno dos azóis, um estudo realizado anteriormente relatou que pacientes podem apresentar resistência a esta classe de fármacos. Isto devido a testes realizados *in vitro* onde os parasitos na presença de fluconazol (**17**) em um período de quatro meses apresentaram resistência cruzada a outros azóis, como o cetoconazol (**18**) e itraconazol (**19**), o que poderia ocasionar

uma barreira para o avanço do tratamento da DC pelos compostos azólicos.⁶² Somado a isso, a falta de conhecimentos estruturais sobre o local de ligação dos fármacos prejudicava o trabalho de otimização dos compostos azólicos quanto à atividade sobre o *T. cruzi*. Contudo, o conhecimento recente da estrutura cristalina das CYP51 do *T. cruzi* e do *T. brucei* cocrystalizadas com os inibidores fluconazol (**17**) ou posaconazol (**24**), permitiu de forma racional o desenvolvimento de novos fármacos tripanocidas com elevadas atividades.^{63,64}

Abaixo encontra-se a **Figura 13**, mostrando o número de trabalhos publicados no período de 2003 a 2014 contendo os termos “CYP51” ou “sterol 14 α -demethylase” e “*Trypanosoma cruzi*”, disponíveis na base de dados Scopus. Podemos observar um crescimento acentuado do número de trabalhos a partir do ano de 2010, quando foi disponibilizada a estrutura cocrystalizada da CYP51 com alguns dos seus inibidores.

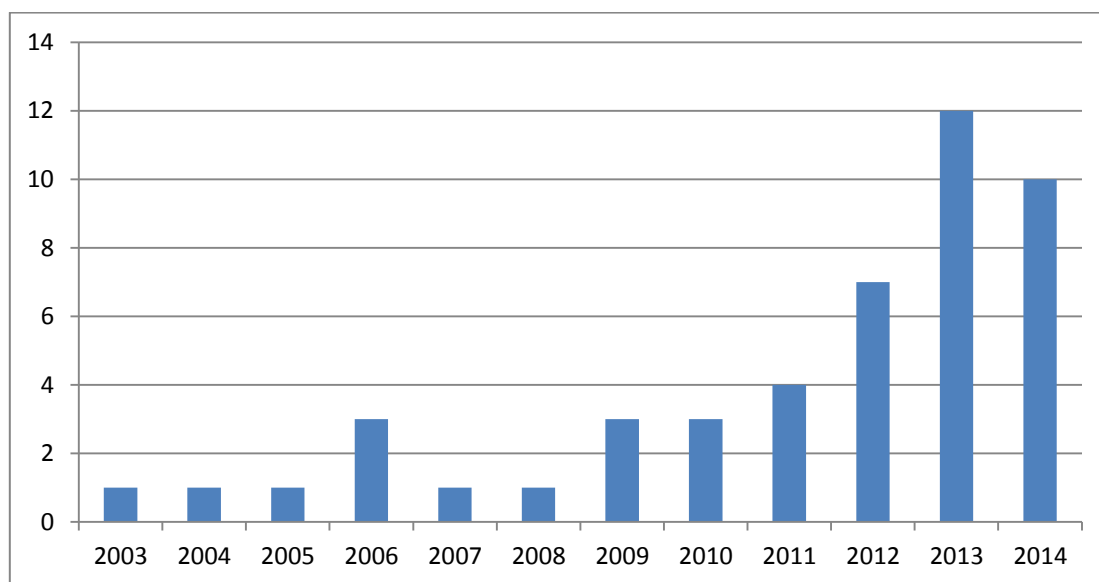


Figura 13. Trabalhos publicados no período de 2003 a 2014, contendo os termos “CYP51” ou “sterol 14 α -demethylase” e “*Trypanosoma cruzi*” disponíveis na base de dados Scopus (Fonte: <http://www.scopus.com/>). Pesquisa realizada em 05/02/2015

Franklin e colaboradores descreveram o planejamento, síntese e a avaliação da atividade tripanocida de derivados heterocíclicos da classe dos 1,2,4-triazolo-3-

tionas, preparados a partir da amida natural piperina (**35**), principal constituinte químico dos frutos de *Piper nigrum* (pimenta do reino). Este produto natural é acessível e de

fácil isolamento, tornando-se atraente ao planejamento e síntese de novas moléculas com potencial aplicação como fármacos antiparasitários. Este trabalho teve como ponto de partida as informações quanto as atividades tripanocidas da piperina e de seus análogos, relatada anteriormente pelo mesmo grupo.^{65,66} Outro dado relevante no planejamento dos derivados triazólicos envolveu a conhecida atividade da amida natural na inibição de enzimas do sistema microsomal hepático, responsáveis pela detoxificação de xenobióticos.⁶⁷ Para o planejamento dos novos derivados triazólicos diferentemente substituídos teve-se como

base as estratégias do bioisosterismo e da hibridação molecular, uma vez que o núcleo 1,2,4-triazolo-3-tiona é o farmacóforo presente no antifúngico comercialmente disponível protoconazol.⁶⁸ O derivado substituído no núcleo triazólico pelo radical cicloexila (**36f**, **Figura 14**) foi o que apresentou melhor perfil de atividade contra as formas proliferativas do *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), apresentando valores de CI_{50} de 18,3 e 8,87 μ M contra formas epimastigota e amastigota, respectivamente. A CYP51 do *T. cruzi* é o provável alvo destes novos triazóis, derivados da piperina.⁶⁹

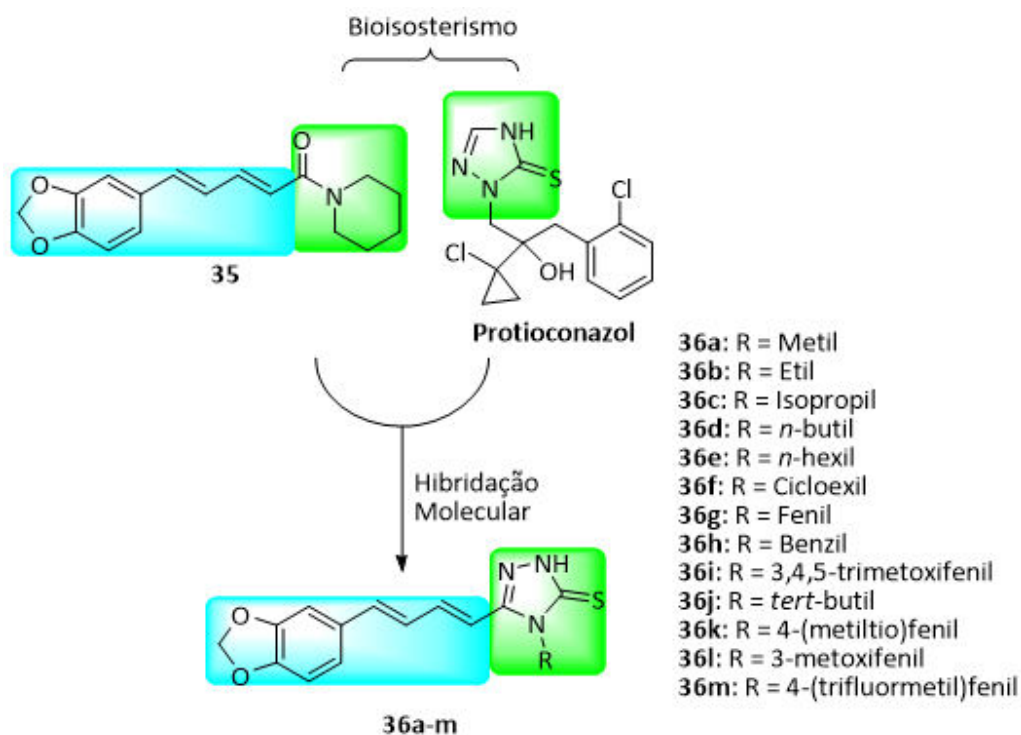


Figura 14. Piperina (**35**) e seus derivados triazólicos (**36a-36m**), ativos contra o *T. cruzi*, planejados como inibidores da 14 α -desmetilase

Compostos imidazólicos peptidomiméticos (**37-42**) também mostraram elevada atividade contra o *T. cruzi*. Os derivados **38-42**, originados do composto FTI-2220 (**37**, **Figura 15**) que possui potencia inibitória sobre a proteína farnesiltransferase (PFT) do *T. brucei* (IC_{50} de 8 nM), foram planejados também como inibidores da PFT, mas durante os estudos foi observado que agiam sobre a CYP51. Estes

derivados foram então administrados por via oral em camundongos com infecção aguda da DC, levando a 100% de sobrevivência com diminuição expressiva da parasitemia. O alvo destes compostos, a CYP51, foi confirmado por estudos de marcação metabólica, junto a análises de perfil lipídico por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.^{53,70}

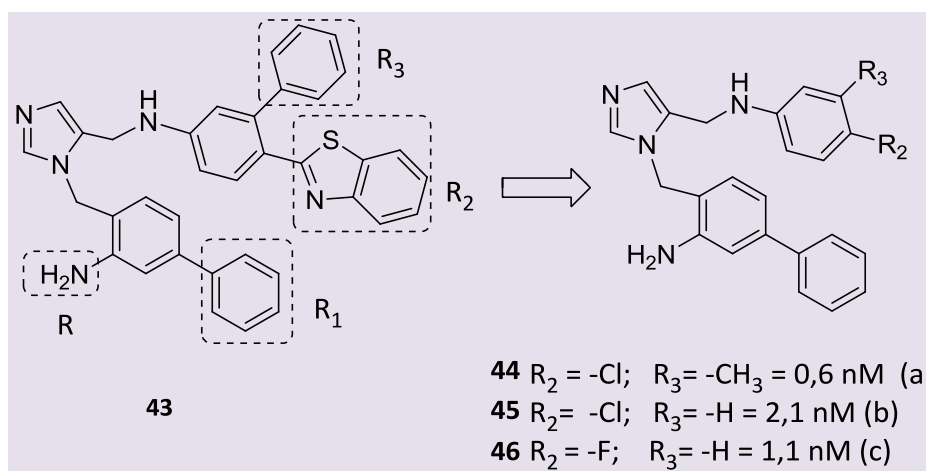


Figura 16. Novos compostos dialquylimidazólicos (**44-46**) com potente ação anti-*T. cruzi* derivados simplificados do protótipo(**43**)

Através de ensaios bioquímicos em larga escala (HTS), Andriani e colaboradores estudaram a relação estrutura-atividade de uma classe de compostos baseados no núcleo imidazólico e relataram que este quimiotipo inibe a CYP51 de *T. cruzi*, hipótese confirmada por análises cristalográficas de raio-X. Estes pesquisadores mostraram que o

composto imidazólico (**47**, **Figura 17**), apresenta-se como um ligante eficiente, $EC_{50} = 0,08 \mu\text{M}$, com alta seletividade em relação a células do hospedeiro e pode ser preparado através de uma rota sintética curta, contrastando com outros inibidores da CYP51, o que o coloca como um protótipo promissor para futuras otimizações.⁷³

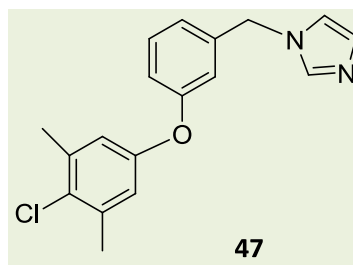


Figura 17. Composto imidazólico (**47**), um ligante eficiente e seletivo da CYP51 de *T. cruzi*

Outro composto que apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* sobre o *T. cruzi* foi o composto antiarrítmico amiodarona (**48**) (**Figura 18**), que é frequentemente indicado para o tratamento sintomático de pacientes com DC e também tem sido apresentado como antifúngico. Este composto age

sinergicamente com o posaconazol (**24**), prejudicando a homeostase de Ca^{+2} do parasita, além de bloquear a biossíntese de ergosterol. Este estudo revelou a possibilidade do uso de terapias combinadas para o tratamento da DC.⁷⁴

para a seletividade observada para estes compostos frente ao alvo da enzima contra outros citocromos P450. A elevada potencia inibitória dos compostos (**51**) e (**52**) pode ser

justificada pelo encaixe ótimo entre as moléculas inibidoras e a topologia do sitio ativo da CYP51 de *T. cruzi*.⁷⁷

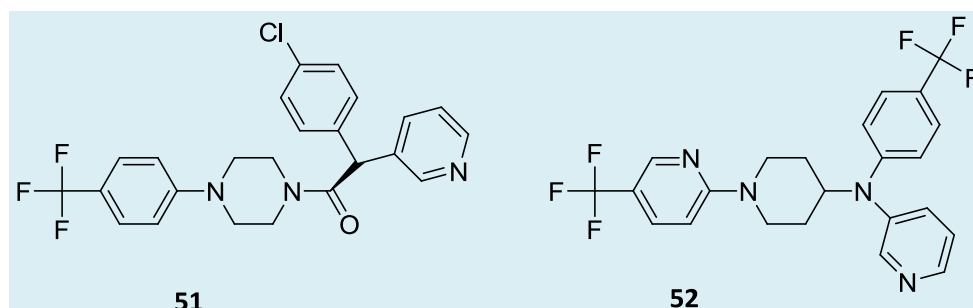


Figura 20. Os compostos não azólicos UDO (**51**) e UDD (**52**) se mostraram potentes e seletivos inibidores contra CYP51 em *T. cruzi*

Outro inibidor da CYP51 não-azólico que apresentou taxa de 60% de cura parasitológica em camundongos infectados com o *T. cruzi*, foi LP10 (**53**) ($EC_{50} = 0,65 \mu\text{M}$), derivado 4-aminopiridina, identificado por HTS,⁷⁸ **Figura 21**. Seguindo esta linha de pesquisa, Choi e colaboradores sintetizaram análogos do isômero S do composto LP10, desenvolvidos a partir de considerações baseadas na estrutura do composto **53** somado a análises de estabilidade microsossomal e inibição sobre a CYP51 do *T. cruzi*, com o intuito de otimizá-los frente ao composto de origem. Os derivados (**54**), (**55**), (**56**), (**57**) e (**58**) apresentaram atividade expressiva sobre a forma amastigota do parasita, cultivado em mioblastos humanos, com destaque para os compostos **55** e **57** com $EC_{50} = 0,014$ e $0,018 \mu\text{M}$, respectivamente. Além disso, a maioria dos derivados sintetizados apresentou melhoria na estabilidade microsossomal e na atividade bioquímica somada à seletividade contra CYP's humana, o que foi compreendido pelo estudo da relação estrutura-atividade dos derivados.⁷⁹ Já o isômero R deste derivado do D-triptofano, foi 1000 vezes mais potente

que o enantiômero S do LP10 (**53**). Os compostos com configuração R foram desenvolvidos a partir de estudos de cristalografia de raio-X da estrutura da enzima cocristalizada com o inibidor S (**54**) complexado com a CYP51 do *T. brucei* e por fim, comparados com o posaconazol quanto ao modo de ligação no sitio ativo da CYP51. Com base nesta informação foi sintetizada uma série de análogos do estereoisômero mais ativo (**59-65**) que apresentaram potente atividade tripanocida, comprovando assim sua eficácia no tratamento da DC, qualificando esta série como um modelo interessante para futuras otimizações.⁸⁰

O fungicida atóxico, fenarimol (**66**), utilizado para fins agrícolas, foi descoberto como potente inibidor sobre o *T. cruzi*, com provável atuação sobre a CYP51 (**Figura 22**). Seus análogos, preparados através de estudos da REA, foram ainda mais ativos destacando-se o composto (**67**) com potente atividade sobre o *T. cruzi*, sendo capaz de suprimir a parasitemia para níveis indetectáveis numa dose oral de 20 mg/Kg/dia, durante 20 dias.⁸¹

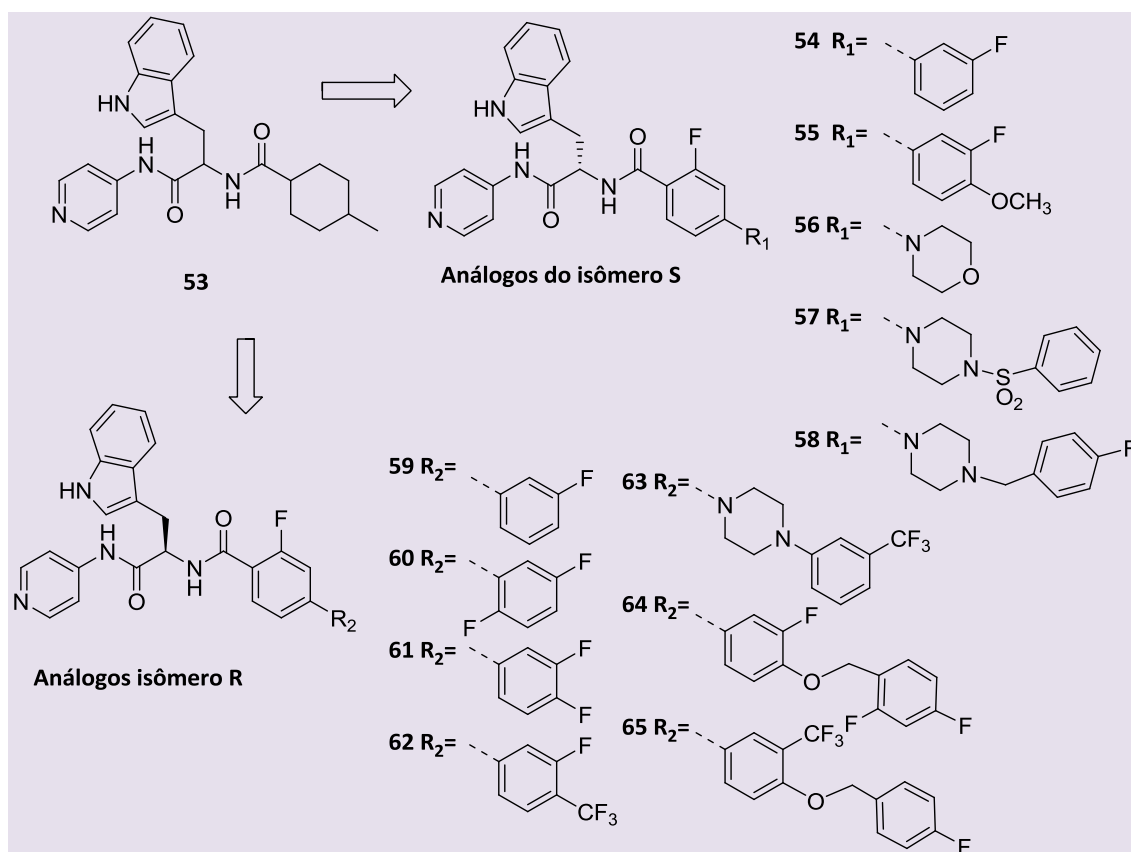


Figura 21. LP 10 (53) e seus análogos (54-65), derivados do D-triptofano

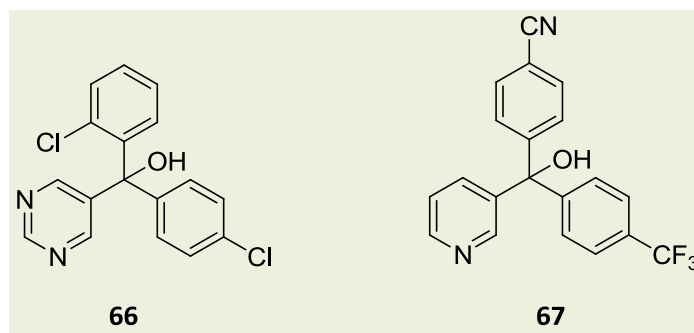


Figura 22. Fenarimol (66) e seu análogo (67), ativos contra o *T. cruzi*

4. Questões de seletividade

No âmbito do desenvolvimento de novos quimioterápicos com atividade antiparasitária, o paradigma que rege o método racional de descoberta de moléculas potencialmente bioativas foi aquele originalmente proposto por Ehrlich, em sua concepção de que para cada doença haveria

um alvo específico e que o fármaco ideal para seu tratamento deveria atuar unicamente neste alvo.⁸² Este conceito serviu de base para o desenvolvimento de fármacos ao longo da história da Química Medicinal e foi de suma importância para o entendimento e controle de diversas doenças até então intratáveis. Entretanto, dois problemas estão intimamente associados a este paradigma: a seletividade do fármaco nem sempre é alcançada de forma a eliminar

completamente efeitos colaterais e há doenças onde considerar um único alvo não é a melhor abordagem para o seu tratamento.

Dentro do escopo de quimioterapia antiparasitária envolvendo a CYP51 como alvo, o maior problema associado à seletividade se deve ao grande número de enzimas estruturalmente semelhantes, tanto no parasito (fungo ou protozoário) quanto no hospedeiro. Mesmo havendo pouca similaridade entre as enzimas,¹⁹ a estrutura do sítio ativo (que contém o grupo heme) se mantém não apenas entre isoformas de CYP51 de diferentes espécies, mas de outras enzimas microsossomais dos organismos envolvidos.⁴ Diversos antifúngicos, inibidores de CYP51, tiveram seu uso descontinuado em decorrência de hepatotoxicidade, devido à inibição de outras enzimas do sistema microsossomal hepático.^{83,84} A exposição a

inibidores da CYP51 a longo prazo pode causar efeitos deletérios sobre a biossíntese celular de esteroides e à inibição de enzimas do sistema microsossomal hepático, causando problemas na esteroidogênese e no metabolismo de fase I de fármacos e xenobióticos, o que pode causar intoxicação, caso haja aumento exagerado de toxinas na corrente sanguínea, que normalmente seriam metabolizadas.⁸⁵

Outro exemplo de interação inespecífica de inibidores da CYP51 envolve a CYP19 (ou aromatase). A CYP19 é uma enzima localizada no retículo endoplasmático, responsável pela desmetilação na posição 10 de diferentes esteroides, *e.g.* na conversão de androstenodiona (**68**) em estrona (**69**) ou testosterona (**70**) em estradiol (**71**),⁸⁶ como visto na **Figura 23**.

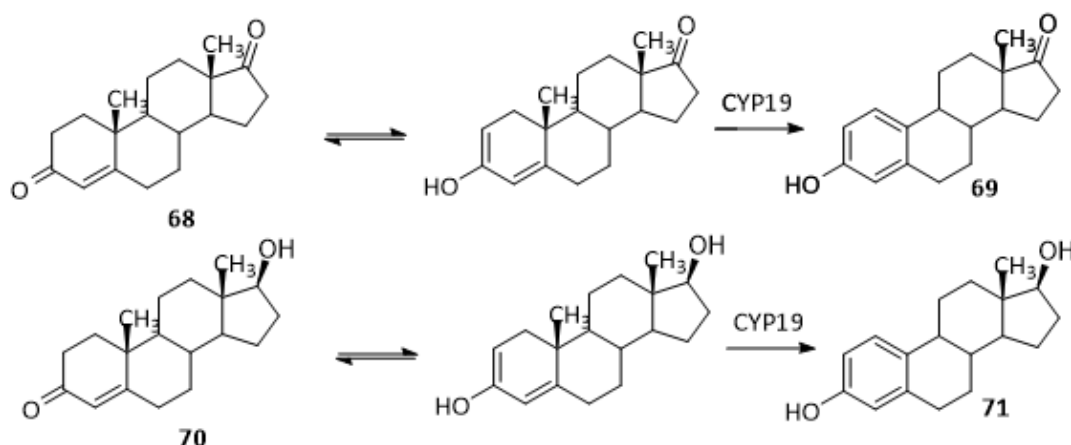


Figura 23. Principais reações catalisadas pela aromatase (CYP19): conversão de androstenodiona (**68**) em estrona (**69**) e testosterona (**70**) em estradiol (**71**)

A redução dos níveis de estradiol pela inibição da CYP19 é o princípio de fármacos como o letrozol (**72**), e que são utilizados no tratamento de cânceres de mama hormônio-dependentes.⁸⁷ Como pode ser visto na **Figura 24**, há grande semelhança estrutural entre o letrozol (**72**) e um inibidor triazólico clássico de CYP51 como, por exemplo, o voriconazol (**23**). O grupamento farmacofórico de ancoramento no grupo

heme das respectivas enzimas se mantém como um 1-alkil-1,2,4-triazol. O grupamento 2,4-difluór-fenil do voriconazol é substituído por uma 4-benzonitrila, através de um bioisosterismo de anéis,⁸⁸ onde se mantém o mesmo tipo de efeito indutivo do substituinte (retirada de elétrons do anel aromático). Dessa forma, fica evidente a semelhança estrutural entre inibidores clássicos das duas enzimas, o que justifica a

possibilidade de interação entre estes dois fármacos e os dois alvos para os quais foram planejados. De fato, Trösken e colaboradores verificaram que diversos antifúngicos azólicos, inibidores de CYP51, também são inibidores de CYP19, sendo que alguns deles apresentam valores de Cl_{50} na mesma ordem

de grandeza dos fármacos planejados para a inibição desta enzima, como o miconazol (**73**).⁸⁹ A principal consequência desta interação indesejável é a influência da utilização de antifúngicos azólicos sobre a biossíntese de estrogênios (como o estradiol) no hospedeiro.⁹⁰

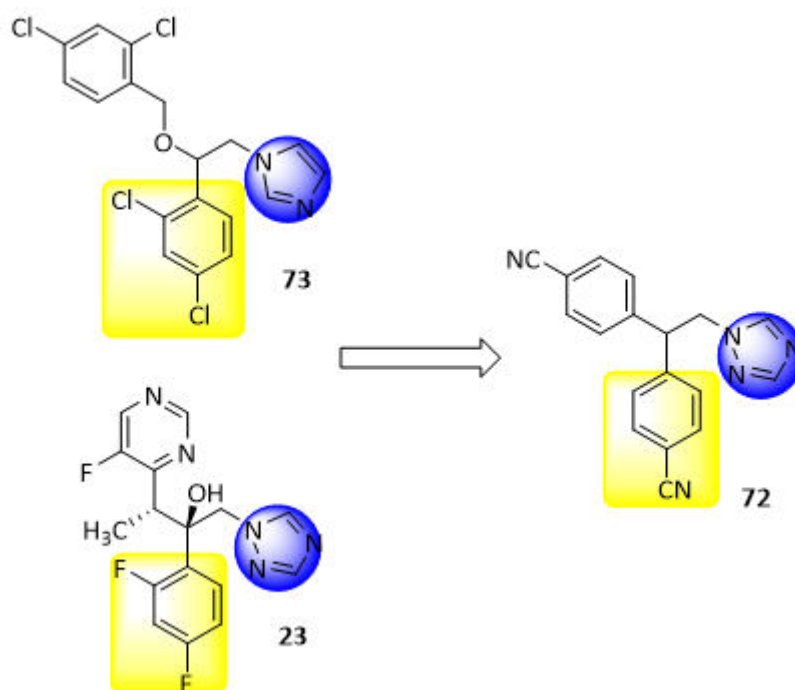


Figura 24. Estruturas do voriconazol (**23**) e miconazol (**73**), inibidores de CYP51, e do letrozazol (**72**), inibidor de CYP19. Em azul, o farmacóforo heterocíclico (triazol ou imidazol) responsável pela ligação com o grupo heme das respectivas enzimas. Em amarelo, os substituintes aromáticos bioisotéricos dos três azóis

Desta forma, o desenvolvimento de novos antiparasitários azólicos, inibidores de CYP51, deve ser conduzido de modo a se verificar sistematicamente sua ação sobre outras formas de CYP, a fim de se minimizar os efeitos colaterais oriundos por eventuais interações com outras metaloenzimas, importantes na manutenção de funções vitais no organismo do hospedeiro.

Uma outra questão, que perpassa o conceito da “bala-mágica” de Ehrlich, é a consideração de que os processos patológicos possuem componentes multifatoriais.⁹¹ A DC, por exemplo, envolve pelo menos duas formas evolutivas do *T.*

cruzi no hospedeiro (amastigota e tripomastigota, com diferenças bioquímicas e estruturais) e diversas células do hospedeiro passíveis de infecção. Os processos de invasão celular, de reprodução, e de evasão do sistema imunológico do hospedeiro do parasito são mediados por diversas enzimas e receptores, o que torna razoável a hipótese de que moduladores múltiplos possuam uma maior chance de lograr sucesso no controle desta infecção. Como exemplo dos aspectos multifatoriais no processo de infecção e manutenção do parasito no organismo hospedeiro, Freire-de-Lima e colaboradores demonstraram que a presença de células

apoptóticas aumenta a replicação do parasito em culturas de macrófagos infectados por *T. cruzi*, e que a presença de anti-inflamatórios não-esteroidais (como o ácido acetilsalicílico) diminui a quantidade de parasitos *in vitro* e *in vivo*, evidenciando a participação de outros mediadores no processo de infecção.⁹²

5. Conclusões e perspectivas

O planejamento de novos quimioterápicos antiparasitários, que possuam como alvo a lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51) de fungos ou de *T. cruzi*, apresenta-se como um desafio importante na área da Química Medicinal, permitindo somar novas alternativas ao arsenal terapêutico atualmente disponível. Além do objetivo de se obter moléculas que possuam um espectro de ação amplo, deve-se levar em consideração a seletividade destas novas moléculas em relação outras enzimas do citocromo P-450, que possam vir a mostrar efeitos deletérios sobre o organismo do hospedeiro. O paradigma da “bala-mágica” de Ehrlich também deve ser reavaliado, uma vez que as parasitoses são doenças multifatoriais que podem ser mais bem controladas com a ação sinérgica do candidato a fármaco sobre mais de um alvo envolvido no processo fisiopatológico da infecção, o que é um fato incontestável no caso da doença de Chagas. Uma vez evidenciado o perfil de atividade de um novo inibidor de CYP51 devem também ser estudados todos os potenciais efeitos tóxicos desta nova molécula, de forma a tornar possível a avaliação do custo-benefício do seu uso no tratamento de pacientes para que o mesmo seja, enfim, transformado em fármaco.

Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES pelas bolsas dos doutorandos V.S.S. e N.D.L., ao CNPq pela bolsa PDJ concedida à Dra. T.N.F.

Os autores são ainda gratos à CAPES-PROCAD e à FAPERJ pelos apoios financeiros e ao Dr. V.M. Rumjanek (UFRRJ) pela leitura crítica do manuscrito.

Referências Bibliográficas

- ¹ Omura, T.; Sato, R. A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry* **1962**, *237*, 1375. [[PubMed](#)]
- ² Mack, J.; Stillman, M. J. Em *The Porphyrin Handbook*, Kadish, K. M., Smith, K. M., Guillard, S. R., eds.; Academic Press: Amsterdam, 2003, cap 103. [[Link](#)]
- ³ Meunier, B.; Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 3947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Nelson, D. R.; Koymans, L.; Kamataki, T.; Stegeman, J. J.; Feyereisen, R.; Waxman, D. J.; Waterman, M. R.; Gotoh, O.; Coon, M. J.; Estabrook, R. W.; Gunsalus, I. C.; Nerbert, D. W. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **1996**, *6*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵ Li, X.; Schuler, M. A.; Berenbaum, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Reviews of Entomology* **2007**, *52*, 231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Hanukoglu, I. Electron Transfer Proteins of Cytochrome P450 Systems. *Advances in Molecular and Cell Biology* **1996**, *14*, 29. [[Link](#)]
- ⁷ Bruschi, M.; Guerlesquin, F. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiology Reviews* **1988**, *4*, 155. [[PubMed](#)]
- ⁸ Brown, G. D. The biosynthesis of steroids and triterpenoids. *Natural Product Reports* **1998**, *15*, 653. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Hess-Jr, B. A.; Smentek, L. The concerted nature of the cyclization of squalene oxide to the protosterol cation. *Angewandte Chemie International Edition* **2013**, *52*, 11029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ¹⁰ Harrison, D. M. The biosynthesis of triterpenoids and steroids. *Natural Product Reports* **1985**, *2*, 525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Daum, G.; Lees, N. D.; Bard, M.; Dickson, R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **1998**, *14*, 1471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Canonica, L.; Fiecchi, A.; Kienle, M. G.; Scala, A.; Galli, G.; Paoletti, E. G.; Paoletti, R. The fate of the 15-beta hydrogen of lanosterol in cholesterol biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90*, 3597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Alexander, K.; Akhtar, M.; Boar, R. B.; McGhie, J. F.; Barton, D. H. R. The removal of the 32-carbon atom as formic acid in cholesterol biosynthesis. *Journal of the Chemical Society: Chemical Communications* **1972**, 383. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Mitropoulos, K. A.; Gibbons, G. F.; Reeves, B. E. Lanosterol 14alpha-demethylase. Similarity of the enzyme system from yeast and rat liver. *Steroids* **1976**, *27*, 821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Aoyama, Y.; Yoshida, Y. The 14alpha-demethylation of lanosterol by a reconstituted cytochrome P-450 system from yeast microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1978**, *85*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Kalb, V. F.; Loper, J. C.; Dey, C. R.; Woods, C. W.; Sutter, T. R. Isolation of a cytochrome P-450 structural gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **1986**, *45*, 237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Yoshida Y.; Aoyama, Y. Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-45014DM purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. *Biochemical Pharmacology* **1987**, *36*, 229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Podust, L. M.; Poulos, T. L.; Waterman, M. R. Crystal structure of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylase (CYP51) from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with azole inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 3068. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Lepesheva, G. I.; Virus, C.; Waterman, M. R. Conservation in the CYP51 Family. Role of the B' Helix/BC Loop and Helices F and G in Enzymatic Function. *Biochemistry* **2003**, *42*, 9091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Shyadehi, A. Z.; Lamb, D. C.; Kelly, S. L.; Schunck, W. H.; Wright, J. N.; Corina, D.; Akhtar, M. The mechanism of the acyl-carbon bond cleavage reaction catalyzed by recombinant sterol 14 alpha-demethylase of *Candida albicans* (other names are: lanosterol 14 alpha-demethylase, P-45014DM, and CYP51). *The Journal of Biological Chemistry* **1996**, *271*, 12445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Garcia-Solache, M. A.; Casadevall, A. Global warming will bring new fungal diseases for mammals. *mBio* **2010**, *1*, e00061-10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Martin, G. S.; Mannino, D. M.; Eaton, M. D. S.; Moss, M. M. D. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England Journal of Medicine* **2003**, *348*, 1546. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
- ²³ a) Pfaller, M. A.; Diekema, D. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Journal Clinical Microbiology* **2007**, *20*, 133; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] b) McNeil, M. M.; Nash, S. L.; Hajjeh, R. A.; Phelan, M. A.; Conn, L. A.; Plikaytis, B. D.; Warnock, D. W. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clinical Infectious Diseases* **2001**, *33*, 641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁴ Nowosielski, M.; Hoffmann, M.; Wyrwicz, L. S.; Stepniak, P.; Plewczynski, D. M.; Lazniewski, M.; Ginalski, K.; Rychlewski, L. Detailed mechanism of squalene epoxidase inhibition by terbinafine. *Journal of Chemical Information and Modeling* **2011**, *51*, 455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁵ Anderson, T. M.; Clay, M. C.; Cioffi, A. G.; Diaz, K. A.; Hisao, G. S.; Tuttle, M. D.; Nieukoop, A. J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; Uno, B. E.; Wildeman, E. L.; Gonen, T.; Rienstra, C. M.; Burke, M. D. Amphotericin forms an extra membranous and fungicidal sterol sponge. *Nature Chemical Biology* **2014**, *10*, 400. [[Link](#)]
- ²⁶ White, T. C.; Marr, K. A.; Bowden, R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance.

- Clinical Microbiology Reviews* **1998**, *11*, 382. [[PubMed](#)]
- ²⁷ Lupetti, A.; Danesi, R.; Campa, M.; Del Tacca, M.; Kelly, S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *Trends in Molecular Medicine* **2002**, *8*, 76. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Turner, M. S.; Drew, R. H.; Perfect, J. R. Emerging echinocandins for treatment of invasive fungal infections. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **2006**, *11*, 231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁹ Shapiro, R. S.; Robins, N.; Cowen, L. E. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2011**, *75*, 213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Abe, F.; Usuki, K.; Hiraki, T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **2009**, *48*, 8494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ a) Cowen, L. E. Predicting the emergence of resistance to antifungal drugs. *FEMS Microbiology Letters* **2001**, *204*, 1; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] b) Maisnier-Patin, S.; Andersson, D. I. Adaptation to the deleterious effects of antimicrobial drug resistance mutations by compensatory evolution. *Research in Microbiology* **2004**, *155*, 360; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] c) Chakrabarti, A. Drug resistance in fungi – an emerging problem. *WHO-Regional Health Forum* **2011**, *15*, 97. [[CrossRef](#)]
- ³² Wilson, L. S.; Reyes, C. M.; Stolpman, M.; Speckman, J.; Allen, K.; Beney, J. The direct cost and incidence of systemic fungal infections. *Journal Value Health* **2002**, *5*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Ji, H.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Zhang, M.; Zhu, J.; Song, Y.; Lu, J. A three-dimensional model of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43*, 2493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Sheng, C.; Zhang, W.; Zhang, M.; Song, Y.; Ji, H.; Zhu, J.; Yao, J.; Yu, J.; Yang, S.; Zhou, Y.; Zhu, J.; Lu, J. Homology modeling of lanosterol 14 α -demethylase of *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* and insights into the enzyme-substrate interactions. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2004**, *22*, 91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁵ Che, X.; Sheng, C.; Wang, W.; Cao, Y.; Xu, Y.; Ji, H.; Dong, G.; Miao, Z.; Yao, J.; Wannian, Z. New azoles with potent antifungal activity: Design, synthesis and molecular docking. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *44*, 4218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁶ Babazadeh-Qazijahani, M.; Badali, H.; Irannejad, H.; Afsarian, M. H.; Emami, S. Imidazolylchromanones containing non-benzylic oxime ethers: synthesis and molecular modeling study of new azole antifungals selective against *Cryptococcus gattii*. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *76*, 264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Emami, S.; Falahati, M.; Banifatemi, A.; Moshiri, K. A.; Shafiee, A. Stereoselective synthesis and *in vitro* antifungal evaluation of (*E*)- and (*Z*)-Imidazolylchromanone oxime ethers. *Archiv der Pharmazie* **2002**, *335*, 318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Cabral, M. E.; Figueroa, L. I. C.; Fariña, J. I. Actividad antifúngica sinérgica de combinaciones de estatinas y azólicos revelada mediante bioanálisis con *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida utilis* y cuantificación de ergosterol. *Revista Iberoamericana de Micología* **2013**, *30*, 31. [[CrossRef](#)]
- ³⁹ Manzoni, M.; Rollini, M. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2002**, *58*, 555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Kelly, S. L.; Arnoldi, A.; Kelly, D. E. Molecular genetic analysis of azole antifungal mode of action. *Biochemical Society Transaction* **1993**, *21*, 1034. [[PubMed](#)]
- ⁴¹ de Azevedo, W. F. Jr; Soares, M. B. Selection of targets for drug development against protozoan parasites. *Current Drug Targets* **2009**, *10*, 193. [[PubMed](#)]
- ⁴² Dias, L. C.; Dessoay, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento

- de novos fármacos. *Química Nova* **2009**, *32*, 2444. [[CrossRef](#)]
- ⁴³ Zanatta, N.; Amaral, S. S.; Santos, J. M.; Mello, D. L.; Fernandes, L. S.; Bonacorso, H. G.; Martins, M. A. P.; Andricopulo, A. D.; Borchhardt, D. M. Convergent synthesis and cruzain inhibitory activity of novel 2-(*N*'-benzylidenehydrazino)-4-trifluoromethyl-pyrimidines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 10236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Lapesheva, G. I.; Waterman, M. R. Sterol 14 α -demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2011**, *11*, 2060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Urbina, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* **1997**, *114*, S91. [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Lapesheva, G. I.; Zaitseva, N. G.; Nes, W. D.; Zhou, W.; Arase, M.; Liu, J.; Hill, G. C.; Waterman, M. R. CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: a phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 α -demethylase. *The Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, 3577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ McCabe, R. E.; Remington, J. S.; Araujo, F. G. In vitro and in vivo effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1986**, *32*, 280. [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ McCabe, R. E.; Remington, J. S.; Araujo, F. G. Ketoconazole promotes parasitological cure of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1987**, *83*, 613. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ McCabe, R. E.; Araujo, F. G.; Remington, J. S. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1983**, *32*, 960. [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Pfaller, M. A.; Krogstad, D. J. Imidazole and polyene activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Journal of Infectious Diseases* **1981**, *144*, 372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵¹ Berman, J. D. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophage cultures. *American Journal of Tropical and Medical Hygiene* **1981**, *30*, 566. [[PubMed](#)]
- ⁵² Urbina, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵³ Buckner, F. S.; Joubert, B. M.; Boyle, S. M.; Eastman, R. T.; Verlinde, C. L. M. J.; Matsuda, S. P. T. Cloning and analysis of *Trypanosoma cruzi* lanosterol 14-demethylase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **2003**, *132*, 75. [[PubMed](#)]
- ⁵⁴ França, R. R. F.; Carvalho, A. S.; Branco, F. S. C.; Pinto, A. C.; Boechat, N. Inibidores potentes da enzima esterol 14 α -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. *Revista Virtual em Química* **2014**, *6*, 1483. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁵ Hucke, O.; Gelb, M. H.; Verlinde, C. L. M. J.; Buckner, F. S. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 5415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁶ a) Urbina, J. A.; Payares, G.; Molina, J.; Sanoja, C.; Liendo, A.; Lazard, K.; Piras, M. M.; Perez, N.; Wincker, P.; Ryley, J. F. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science* **1996**, *273*, 969; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] b) Molina, J.; Martins-Filho, O.; Brener, Z.; Romanha, A. J.; Loebenberg, D.; Urbina, J. A. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, *44*, 150. [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Urbina, J. A.; Lira, R.; Visbal, G.; Bartrolí, J. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2000**, *44*, 2498. [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Urbina, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *Journal of*

Molecular Medicine **1999**, *77*, 332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁵⁹ a) Williams, K. J.; Denning, D. W. Termination of development of D0870. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2001**, *47*, 720; [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] b) Buckner, F. S.; Urbina, J. A. Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease. *International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance* **2012**, *2*, 236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶⁰ Urbina, J. A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Molina, J.; Lira, R.; Brener, Z.; Romanha, A. J. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2003**, *21*, 39. [[CrossRef](#)]

⁶¹ Guedes, P. M. M.; Urbina, J. A.; Lana, M.; Afonso, L. C. C.; Veloso, V. M.; Tafuri, W. L.; Machado-Coelho, G. L. L.; Chiari, E.; Bahia, M. T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2004**, *48*, 4286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶² Buckner, F. S.; Wilson, A. J.; White, T. C.; van Voorhis, W. C. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, *42*, 3245. [[PubMed](#)]

⁶³ Tripodi, K. E. J.; Menendez-Bravo, S. M.; Cricco, J. A. Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. *Enzyme Research* **2011**, *2011*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶⁴ Chen, C. K.; Leung, S. S. F.; Guilbert, C.; Jacobson, M. P.; McKerrow, J. H.; Podust, L. M. Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *Plos Neglected Tropical Diseases* **2010**, *4*, e651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶⁵ Ribeiro, T. S.; Freire-de-Lima, L.; Previato, J. O.; Mendonça-Previato, L.; Heise, N.; Lima, M. E. F. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 3555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶⁶ Ferreira, W. S.; Freire-de-Lima, L.; Saraiva, V. B.; Alisson-Silva, F.; Mendonça-Previato, L.; Previato, J. O.; Echevarria, A.; Lima, M. E. F. Novel 1,3,4-thiadiazolium-2-phenylamine chlorides derived from natural piperine as trypanocidal agents: chemical and biological studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2008**, *16*, 2984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶⁷ Oliveira, R. G.; Alencar-Filho, E. B.; Vasconcellos, M. L. A. A. A influência da piperina na biodisponibilidade de fármacos: uma abordagem molecular. *Química Nova* **2014**, *37*, 69. [[CrossRef](#)]

⁶⁸ Parker, J. E.; Warrilow, A. G. S.; Cools, H. J.; Fraaije, B. A.; Lucas, J. A.; Rigdova, K.; Griffith, W. J.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Prothioconazole and prothioconazole-desthio activities against *Candida albicans* sterol 14- α -demethylase. *Applied Environmental Microbiology* **2013**, *79*, 1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶⁹ Franklim, T. N.; Freire-de-Lima, L.; Diniz, J. N. S.; Previato, J. O.; Castro, R. N.; Mendonça-Previato, L.; Lima, M. E. F. Design, synthesis and trypanocidal evaluation of novel 1,2,4-triazoles-3-thiones derived from natural piperine. *Molecules* **2013**, *18*, 6366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁰ Ohkanda, J.; Buckner, F. S.; Lockman, J. W.; Yokoyama, K.; Carrico, D.; Eastman, R.; Luca-Fradley, K.; Davies, W.; Croft, S. L.; Van Voorhis, W. C.; Gelb, M. C.; Sebt, S. M.; Hamilton, A. D. Design and synthesis of peptidomimetic protein farnesyltransferase inhibitors as anti-*Trypanosoma brucei* agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2004**, *47*, 432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷¹ Suryadevara, P. K.; Racherla, K. K.; Olepu, S.; Norcross, N. R.; Tatipaka, H. B.; Arif, J. A.; Planer, J. D.; Lepesheva, G. I.; Verlinde, C. L. M. J.; Buckner, F. S.; Gelb, M. H. Dialkylimidazole inhibitors of *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase as anti-Chagas disease agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 6492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷² Lepesheva, G. I.; Ott, R. D.; Hargrove, T. Y.; Kleshchenko, Y. Y.; Schuster, I. Sterol 14 α -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition

- and parasite cell growth. *Chemistry & Biology* **2007**, *14*, 283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷³ Adriani, G.; Amata, E.; Beatty, J.; Clements, Z.; Coffey, B. J.; Courtemanche, G.; Devine, W.; Erath, J.; Juda, C. E.; Wawrzak, Z.; Wood, J. T.; Lepesheva, G. I.; Rodriguez, A.; Pollastri, M. P. Antitrypanosomal lead discovery: identification of a ligand-efficient inhibitor of *Trypanosoma cruzi* CYP51 and parasite growth. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 2556. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁴ Benaim, G.; Sanders, J. M.; Garcia-Marchám, Y.; Colina, C.; Lira, R.; Caldera, A. R.; Payares, G.; Sanoja, C.; Burgos, J. M.; Leon-Rossel, A.; Concepcion, J. L.; Schijman, A. G.; Levin, M.; Oldfield, E.; Urbina, J. A. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *49*, 892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁵ Villalta, F.; Dibish, M. C.; Nde, P. N.; Kleshchenko, Y. Y.; Hargrove, T. Y.; Johnson, C. A.; Waterman, M. R.; Johnston, J. N.; Lepesheva, G. I. VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease. *Journal of Infectious Diseases* **2013**, *208*, 504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁶ Soeiro, M. N. C.; Souza, E. M.; Silva, C. F.; Batista, D. G. J.; Batista, M. M.; Pavão, B. P.; Araújo, J. S. A.; Aiub, C. A. F.; Silva, P. B.; Lionel, J.; Britto, C.; Kim, K.; Sulikowski, G.; Hargrove, T. Y.; Waterman, M. R.; Lepesheva, G. I. *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**, *57*, 4151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁷ Hargrove, T. Y.; Wawrzak, Z.; Alexander, P. W.; Chaplin, J. H.; Keenan, M.; Charman, S. A.; Perez, C. J.; Waterman, M. R.; Chatelain, E.; Lepesheva, G. I. Complexes of *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51) with two pyridine-based drug candidates for Chagas disease: structural basis for pathogen selectivity. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 31602. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁸ Doyle, P. S.; Chen, C. K.; Johnston, J. B.; Hopkins, S. D.; Leung, S. S.; Jacobson, M. P.; Engel, J. C.; McKerrow, J. H.; Podust, L. M. A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2010**, *54*, 2480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁹ Choi, J. Y.; Clavet, C. M.; Gunatilleke, S. S.; Ruiz, C.; Cameron, M. D.; McKerrow, J. H.; Podust, L. M.; Roush, W. R. Rational development of 4-aminopyridyl-based inhibitors targeting *Trypanosoma cruzi* CYP51 as anti-chagas agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 7651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁰ Choi, J. Y.; Calvet, C. M.; Vieira, D. F.; Gunatilleke, S. S.; Cameron, M. D.; McKerrow, J. H.; Podust, L. M.; Roush, W. R. R-configuration of 4-aminopyridyl-based inhibitors of CYP51 confers superior efficacy against *Trypanosoma cruzi*. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2014**, *5*, 434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸¹ Keenan, M.; Abbott, M. J.; Alexander, P. W.; Armstrong, T.; Best, W. M.; Berven, B.; Botero, A.; Chaplin, J. H.; Charman, S. A.; Chatelain, E.; Geldern, T. W. V.; Kerfoot, M.; Khong, A.; Nguyen, T.; McManus, J. D.; Morizzi, J.; Ryan, E.; Scandale, I.; Thompson, R. A.; Wang, S. Z.; White, K. L. Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 4189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸² Strebhardt, K.; Ullrich, A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer* **2008**, *8*, 473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸³ Cunha, L. B.; Freitas, H. F.; Castilho, M. Hologram- and descriptor-based QSAR studies for a series of non-azoles derivatives active against *C. neoformans*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2013**, *24*, 1623. [[CrossRef](#)]
- ⁸⁴ Somchit, N. N., A. R.; Hasiyah, A. H.; Zuraini, A.; Sulaiman, M. R.; Noordin, M. M. Hepatotoxicity induced by antifungal drugs itraconazole and fluconazole in rats: a comparative *in vivo* study. *Human*

- Experimental Toxicology* **2004**,23, 519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁵ Warrilow, A. G.; Parker, J. E.; Kelly, D. E.; Kelly, S. L. Azole affinity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) enzymes from *Candida albicans* and *Homo sapiens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **2013**, 57, 1352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁶ Conley, A. M., S.; Corbin, C. J.; Greger, D.; Walters, K.; Trant, J.; Graham, S. A comparative approach to structure–function studies of mammalian aromatases. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2001**,79, 289. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁷ Reed, M. J.; Purohit, A. Aromatase regulation and breast cancer. *Clinical Endocrinology* **2001**, 54, 563. [[PubMed](#)]
- ⁸⁸ Lima, L. M.; Barreiro, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Current Medicinal Chemistry* **2005**,12, 23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸⁹ Trösken, E. R.; Fischer, K.; Volkel, W.; Lutz, W. K. Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology* **2006**, 219, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹⁰ Zarn, J. A.; Brüscheweiler, B. J.; Schlatter, J. R. Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase. *Environmental Health Perspectives* **2003**,111, 255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹¹ Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. New insights for multifactorial disease therapy: the challenge of the symbiotic drugs. *Current Drug Therapy* **2008**, 3, 1. [[CrossRef](#)]
- ⁹² Freire-de-Lima, C. G.; Nascimento, D. O.; Soares, M. B.; Bozza, P. T.; Castro-Faria-Neto, H. C.; Mello, F. G.; dos Reis, G. A.; Lopes, M. F. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic *Trypanosome* in macrophages. *Nature* **2000**, 403, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]