UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia

Lucas Abreu Diniz

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL IMPACTO DE SUBSTITUIÇÕES EM SUBTIPOS DE CRUZIPAÍNAS NAS INTERAÇÕES COM INIBIDORES

Belo Horizonte

2025

Lucas Abreu Diniz

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL IMPACTO DE SUBSTITUIÇÕES EM SUBTIPOS DE CRUZIPAÍNAS NAS INTERAÇÕES COM INIBIDORES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Profª. Drª. Rafaela Salgado Ferreira

Coorientadoras:

Drª. Estela Mariana Guimarães Lourenço

Profª. Drª. Viviane Corrêa Santos

Belo Horizonte

2025

043 Diniz, Lucas Abreu.
Investigação do potencial impacto de substituições em subtipos de cruzipaínas nas interações com inibidores [manuscrito] / Lucas Abreu Diniz. – 2025.
122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Rafaela salgado Ferreira. Coorientadoras: Dra. Estela Mariana Guimarães Lourenço; Profa. Dra. Viviane Corrêa Santos.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Doença de Chagas. 3. Inibidores de Cisteína Proteinase. I. Ferreira, Rafaela salgado. II. Lourenço, Estela Mariana Guimarães. III. Santos, Viviane Corrêa. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 577.1

Ficha catalografica elaborada pela bibliotecária Fabiane C M Reis - CRB 6 2680

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
31270-901 – Belo Horizonte – MG
e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS ABREU DINIZ. Aos vinte e oito dias do mês de abril de 2025 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Investigação do potencial impacto de substituições em subtipos de cruzipaínas nas interações com inibidores", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Rafaela Salgado Ferreira, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Lucianna Helene Silva dos Santos (Institut Pasteur de Montevideo), aprovado; Dr. Lucas Bleicher (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Estela Mariana Guimarães Lourenço - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Viviane Correa Santos - Coorientadora (Grand Valley State University), aprovado; Dra. Rafaela Salgado Ferreira - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

(x) APROVADO
( ) REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 28 de abril de 2025.

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCIANNA HELENE SILVA DOS SANTOS
Data: 29/04/2025 10:12:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Lucianna Helene Silva dos Santos
(Institut Pasteur de Montevideo)

gov.br Documento assinado digitalmente
LUCAS BLEICHER
Data: 30/04/2025 17:48:52-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dr. Lucas Bleicher
(UFMG)

gov.br Documento assinado digitalmente
ESTELA MARIANA GUIMARAES LOURENCO
Data: 30/04/2025 18:04:09-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Estela Mariana Guimarães Lourenço
Coorientadora (UFMG)

gov.br Documento assinado digitalmente
VIVIANE CORREA SANTOS
Data: 30/04/2025 17:57:12-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Viviane Correa Santos
Coorientadora (Grand Valley State University)

gov.br Documento assinado digitalmente
RAFAELA SALGADO FERREIRA
Data: 29/04/2025 09:48:26-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dra. Rafaela Salgado Ferreira
Orientadora (UFMG)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Denise Maria e João Antônio, pelo carinho, cuidado, amor e apoio incondicional em cada passo da minha trajetória. Ao meu irmão, Vinícius, pela amizade, companheirismo e incentivo constantes. Sem vocês, nada disso seria possível. Dedico este trabalho à minha família com todo o meu amor e gratidão.

À Profª. Drª. Rafaela Salgado Ferreira, por todo o apoio, incentivo e pelas inúmeras oportunidades ao longo da minha formação. Sou profundamente grato pelos ensinamentos compartilhados e pelo tempo dedicado desde a iniciação científica até o mestrado. À Profª. Drª. Viviane Corrêa Santos, pelo conhecimento generosamente transmitido, pelas longas conversas, pelo apoio constante e pela amizade sincera. À Drª. Estela Mariana, pelas discussões científicas acompanhadas de um bom café, pelos ensinamentos, conversas e desabafos, pela paciência, apoio, incentivo e pela amizade ao longo dessa jornada.

Aos membros e ex-membros do Laboratório de Modelagem Molecular e Planejamento de Fármacos (LMMPF), por todos os aprendizados compartilhados ao longo da iniciação científica e do mestrado. À Ana Maria, Beatriz Murta, Estela Mariana, Luiza Barreto, Luan Carvalho, Talita Bernardes e Viviane Corrêa, agradeço pela amizade, conselhos, ensinamentos, conversas e pelos bons momentos que vivemos juntos.

Ao Laboratório de Biodados, pelo acolhimento e pela disponibilização da infraestrutura computacional. Ao Prof. Dr. Miguel Ortega, Juliana Rodrigues e Ryan Fernandes, pelo carinho na recepção, pelos ensinamentos e pelos momentos leves e divertidos.

Aos amigos Guilherme Andrade, Guilherme Campos, Jade Carceroni, Gabriel Ribeiro, João Victor Leles, Samir Charride, Fernando Michetti, Vinicius Abreu, Valquíria Reis, Ricardo Rosa, Larissa Vasconcelos, Julian Fernandez: minha gratidão pelo apoio, incentivo e pelos bons momentos que compartilhamos ao longo dessa jornada.

À Akiko Keller, Binesh Shrestha, Ulrich Hassiepen, Lucien Gazi e todos os envolvidos no programa Next Generation Scientist 2024, pela oportunidade única de participar dessa experiência transformadora. Agradeço também ao Benedikt Goretzki, Luca Egger, Martin Schröder, Zacharias Thiel, David Furkert, Jessica Desogus, Corentin Bon e Maximilian Beckers pelo conhecimento compartilhado, apoio e acolhimento durante minha passagem pelo programa. Aos colegas que se tornaram grandes amigos ao longo dessa experiência, meu muito obrigado por todos os momentos vividos.

À OpenEye Scientific Software, PyMOL, Chimera, Discovery Studio e DOCK 6, pelo acesso aberto ou pela disponibilização de licenças acadêmicas, fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Laboratório Multiusuário de Computação Científica (LCC CENAPAD-MG).

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, pelo apoio financeiro e pela estrutura oferecida ao longo da minha formação.

RESUMO

Apesar de ter sido descoberta em 1909, a doença de Chagas continua sendo um grave problema de saúde pública e social, especialmente na América Latina. Os tratamentos disponíveis apresentam eficácia limitada na fase crônica da doença e estão associados a efeitos adversos significativos. Nesse contexto, a cruzaína (cruzipaína 1), uma cisteíno-protease essencial para a sobrevivência do *Trypanosoma cruzi*, tem sido explorada como alvo terapêutico para o desenvolvimento de novos inibidores. No entanto, apesar do seu potencial, os diferentes subtipos de cruzipaínas ainda são pouco estudados, sobretudo no que diz respeito às variações estruturais que podem influenciar a interação com ligantes. Neste estudo, empregamos abordagens computacionais para investigar os impactos das substituições de aminoácidos nos subtipos de cruzipaínas na interação com inibidores descritos para a cruzaína. Para isso, estabelecemos um protocolo de *docking* molecular, validado por meio de análises de enriquecimento e *redocking*. A análise de enriquecimento revelou que o programa foi capaz de discriminar entre compostos ativos e decoys (AUC = 0,83), enquanto o *redocking* apresentou uma taxa de sucesso de 52%, demonstrando a viabilidade do protocolo para o estudo das cruzipaínas. Modelos estruturais dos diferentes subtipos foram gerados por modelagem comparativa e utilizados nas simulações de *docking*. Substituições nos subsítios S2 e S3 tiveram maior impacto nas poses obtidas, com resíduos volumosos, como Phe61, obstruindo parcialmente essas regiões e influenciando o posicionamento dos ligantes. Além disso, as análises de *rescoring* mostraram que as substituições no sítio ativo também modificam o perfil de interação com os inibidores, resultando em variações nos valores de energia estimada entre as cruzipaínas. As simulações de dinâmica molecular do ligante **16** com as cruzipaínas revelaram variações na estabilidade dos complexos. Para a cruzipaína 2, o inibidor permaneceu no sítio ativo durante toda a simulação. Em contrapartida, a presença de Phe61 e Trp67 na cruzipaína 3.7 resultou em menor estabilidade, refletida pela perda de interação do inibidor com o sítio ativo. Para a cruzipaína 3.9, na qual apenas Trp67 está presente, o impacto sobre a estabilidade foi menos acentuado, com o inibidor permanecendo no sítio ativo por um maior período de simulação. No complexo com a cruzipaína 4, o inibidor apresentou alta instabilidade no sítio ativo em todas as réplicas realizadas. Em particular, a substituição de Glu208 por Gly resultou na perda de uma interação de hidrogênio com o anel fenólico do inibidor, o que pode ter contribuído para a menor estabilidade observada. Esses achados contribuem para a compreensão das diferenças estruturais entre os subtipos de cruzipaínas e seu potencial impacto na interação com inibidores, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra a doença de Chagas.

Palavras-chave: cruzipaína; inibidores; doença de Chagas.

ABSTRACT

Despite being discovered in 1909, Chagas disease remains a major public health and social problem, particularly in Latin America. The available treatments have limited efficacy in the chronic phase of the disease and are associated with significant adverse effects. In this context, cruzain (cruzipain 1), a cysteine protease essential for the survival of *Trypanosoma cruzi*, has been explored as a therapeutic target for the development of new inhibitors. However, despite its potential, the different subtypes of cruzipain are still poorly studied, especially regarding the structural variations that may influence the interaction with ligands. In this study, we employed computational approaches to investigate the impact of substitutions in cruzipain subtypes on the interaction with inhibitors described for cruzain. To achieve this, we established a molecular docking protocol, validated through enrichment and redocking analyses. The enrichment analysis revealed that the program was able to discriminate between active compounds and decoys (AUC = 0.83), while redocking showed a success rate of 52%, demonstrating the protocol's viability for studying cruzipains. Structural models of the different subtypes were generated by comparative modeling and used in docking simulations. The results indicated that substitutions in the S2 and S3 subsites had a greater impact on the obtained poses, with bulky residues such as Phe61 partially obstructing these regions and influencing ligand positioning. Additionally, rescoring analyses showed that substitutions in the active site also modified the interaction profile with the inhibitors, resulting in variations in the estimated energy values between cruzipain subtypes. Molecular dynamics simulations of ligand **16** with cruzipains revealed variations in complex stability. In cruzipain 2, the inhibitor remained in the active site throughout the entire simulation. In contrast, the presence of Phe61 and Trp67 in cruzipain 3.7 led to reduced stability, reflected by the loss of inhibitor interaction with the active site. In cruzipain 3.9, in which only Trp67 is present, the impact on stability was less pronounced, with the inhibitor remaining in the active site for a longer simulation period. In the complex with cruzipain 4, the inhibitor exhibited high instability in the active site across all replicas. Notably, the substitution of Glu208 by Gly resulted in the loss of a hydrogen bond with the phenolic ring of the inhibitor, which may have contributed to the lower stability observed. These findings contribute to the understanding of the structural differences between cruzipain subtypes and their potential impact on interactions with inhibitors, aiding in the development of therapeutic strategies against Chagas disease.

Keywords: cruzipains; inhibitors; Chagas disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi 17
Figura 2 - Medicamentos aprovados para o tratamento da doença de Chagas 19
Figura 3 - Organização dos domínios das cruzipaínas e sua autoativação 21
Figura 4 - Estrutura tridimensional da cruzaína e subsítios envolvidos no reconhecimento de ligantes 22
Figura 5 - Vinilsulfona K11777 e mecanismo de inibição da cruzaína por ligação covalente com este inibidor 24
Figura 6 - Desenvolvimento de inibidores peptídicos da cruzaína baseado no odanacatibe 25
Figura 7 - Exemplo de inibidores não peptídicos irreversíveis da cruzaína 27
Figura 8 - Inibidores não peptídicos contra a cruzaína 28
Figura 9 - Principais substituições encontradas nos subsítios S3 e S1 das cruzipaínas 30
Figura 10 - Principais substituições encontradas nos subsítios S2 e S1' das cruzipaínas. 31
Figura 11 - Moléculas representativas do conjunto de ativos e mapas de calor com coeficientes de Tanimoto 48
Figura 12 - Distribuição de valores obtidos para propriedades físico-químicas dos conjuntos de ativos filtrados pelo DUDE-Z e decoys 49
Figura 13 - Conjunto de 23 ligantes cristalográficos da cruzaína selecionados para este estudo 51
Figura 14 - Performance do protocolo de docking nas análises de enriquecimento 52
Figura 15 - Sobreposição da pose encontrada pelo docking e o modo de ligação cristalográfico de exemplos representativos da classificação aplicada ao redocking 55
Figura 16 - Dispersão dos valores de RMSD em função do número de ligações rotacionáveis dos ligantes. 56
Figura 17 - Gráficos de Ramachandran para os modelos de cruzipaínas 59
Figura 18 - Superfície das cruzipaínas colorida de acordo com potencial lipofílico molecular 60
Figura 19 - Complexo cristalográfico cruzaína-vinilsulfona e resultados de docking do ligante 1 contra a czp2. 61
Figura 20 - Pose melhor pontuada pelo docking para vinilsulfonas contra a czp2 63
Figura 21 - Resultados de docking dos ligantes 5 e 6 contra czp2. 64
Figura 22 - Resultados de docking para os ligantes 3 e 5 contra as cruzipaínas 3 65

Figura 23 - Resultados de docking para os ligantes 2, 3 e 4 contra as cruzipaínas 3. 66
Figura 24 - Resultados de docking para os ligantes 5 e 6 contra as cruzipaínas 3 67
Figura 25 - Resultados de docking para os ligantes 1, 3 e 4.. 68
Figura 26 - Resultados de docking para os para o ligante 5 e 6 69
Figura 27 - Resultados de docking para o ligante 11 contra as czps 2 e 3.7 71
Figura 28 - Resultado de docking para o ligante 11 contra a czp3.9 e czp4 72
Figura 29 - Resultado de docking para o ligante 14 contra os diversos subtipos de cruzipaínas 73
Figura 30 - Estrutura cristalográfica dos complexos PDB 1EWP e 1AIM 74
Figura 31 - Resultado de docking para os ligantes 15 e 16 contra as cruzipaínas 2 e 3.7..... 75
Figura 32 - Resultado de docking para os ligantes 15 e 16 contra as cruzipaínas 3.9 e 4**.**..... 76
Figura 33 - Estrutura cristalográfica dos complexos PDB 1ME4 e 1ME3. 77
Figura 34 - Resultado de docking para os ligantes 20 e 21 contra as cruzipaínas 2 e 3.7..... 77
Figura 35 - Resultado de docking para os ligantes 20 e 21 contra as cruzipaínas 3.9 e 4..... 78
Figura 36 - Análises dos resultados de rescoring pelo método de MM-PBSA. 81
Figura 37 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 em complexo com a czp2..... 84
Figura 38 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 contra a czp3.7. 85
Figura 39 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 contra a czp3.9 87
Figura 40 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 contra a czp4 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Substituições de aminoácidos no sítio ativo das cruzipaínas e frequência de interações de cada posição com ligantes da cruzaína (czp1). 29
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas calculadas para os conjuntos de ativos e decoys 48
Tabela 3 - Valores de RMSD para ligantes submetidos ao redocking contra a cruzaína 53
Tabela 4 - Resultados obtidos para a validação dos modelos de cruzipaínas com Molprobity, ERRAT e Q-MEAN 57
Tabela 5 - Impacto das substituições nas cruzipaínas avaliado através das simulações de docking molecular 79

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
czp	Cruzipaína
DTUs	Discrete Typing Units
REA	Relação estrutura-atividade
PDB	Protein Data Bank
IC_{50}	Concentração inibitória 50%
K_i	Constante de inibição
SAS	*Substrate activity screening*
RMSD	Root Mean Square Deviation
ROC	Receiver Operating Characteristic
AUC	Área sob a curva
EF	Enrichment Factor
BEDROC	Boltzmann-Enhanced Discrimination of ROC
SMILES	Simplified Molecular-Input Line-Entry System
DOPE	Discrete Optimized Protein Energy
MM-PBSA	Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area
CGenFF	*General Force Field*
PME	Particle-mesh Ewald

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

1.1 Doença de Chagas 16

1.2 *Trypanosoma cruzi* 18

1.3 Cruzipaína 19

1.3.1 Desenvolvimento de inibidores da cruzaína 23

1.4 Subtipos de cruzipaínas 28

1.5 Desenvolvimento racional de fármacos 32

1.5.1 Abordagens computacionais aplicados ao desenvolvimento de fármacos 33

1.5.2 Estratégias para validação de protocolo de *docking* molecular 35

2 OBJETIVOS 39

2.1 Objetivo Geral 39

2.2 Objetivos Específicos 39

3 MATERIAIS E MÉTODOS 40

3.1 Definição dos conjuntos de compostos avaliados neste estudo 40

3.2 Análise e caracterização dos conjuntos de compostos 41

3.3 Preparação das moléculas para *docking* molecular 41

3.4 Preparação das estruturas tridimensionais das cruzipaínas 42

3.5 Protocolo de *docking* molecular 42

3.6 Análise de enriquecimento 42

3.7 *Redocking* 43

3.8 Modelagem comparativa dos subtipos de cruzipaínas 43

3.9 *Docking* de inibidores contra os subtipos de cruzipaínas 45

3.10 *Rescoring* de poses de *docking* utilizando MM-PBSA 45

3.11 Simulações de dinâmica molecular de inibidor da cruzaína com modelos das cruzipaínas....45
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES....47
4.1 Validação do protocolo de *docking* molecular....47
4.1.1 Construção e caracterização dos conjuntos de compostos avaliados....47
4.1.2 Análise de enriquecimento....51
4.1.3 *Redocking*....53
4.2 Construção de modelos estruturais para as cruzipaínas....56
4.3 *Docking* molecular de compostos contra os modelos das cruzipaínas....60
4.3.1 Vinilsulfonas....61
4.3.2 Epóxidos....69
4.3.3 Galinamida....72
4.3.4 Fluormetilcetonas....73
4.3.5 Hidroximetilcetona....76
4.4 *Rescoring* dos complexos gerados a partir das simulações de docking molecular....80
4.5 Dinâmica molecular de inibidor contra os subtipos de cruzipaínas....82
4.5.1 Cruzipaína 2....83
4.5.2 Cruzipaína 3.7....84
4.5.3 Cruzipaína 3.9....86
4.5.4 Cruzipaína 4....88
5 CONCLUSÃO....91
REFERÊNCIAS....93
ANEXO 1....110
ANEXO 2....118
ANEXO 3....120
Simulações de dinâmica molecular....120
APÊNDICE....121
Outros projetos desenvolvidos durante o mestrado....121

A) Participação no Programa Next Generation Scientist 2024..... 121

B) Capítulo de Livro..... 121

C) Artigos Publicados..... 121

D) Apresentações em Congresso..... 122

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário parasito *Trypanosoma cruzi (T. cruzi)*. Descoberta em 1909 pelo cientista Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (Chagas, 1909), a doença ainda permanece como um relevante problema de saúde pública. Estima-se que cerca de 6-7 milhões de pessoas estão infectadas globalmente, com 75 milhões de indivíduos vivendo em regiões de risco (WHO, 2024). Além disso, a incidência anual de novos casos aproxima-se de 30.000, enquanto mais de 10.000 mortes associadas à doença são reportadas anualmente (Pérez-Molina; Molina, 2018).

Apesar de ser endêmica em países da América Latina, movimentos migratórios resultaram na dispersão da doença de Chagas para outras regiões não endêmicas (Guhl; Ramírez, 2021). Nos Estados Unidos, por exemplo, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima cerca de 300.000 indivíduos infectados (Centers for Disease Control and Prevention, 2024). Com relação ao impacto econômico global, os custos relacionados aos sistemas de saúde são de aproximadamente US$627 milhões por ano e cerca de US$8 bilhões em perdas econômicas anuais (Lee *et al.*, 2013). Além disso, estima-se de que 80% dos indivíduos infectados não possuem acesso adequado à diagnóstico e tratamento (Pinheiro *et al.*, 2017).

O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário flagelado pertencente à classe Kinetoplastea e a família Trypanosomatidae. Em áreas endêmicas, a transmissão pode ocorrer por insetos triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*, os quais estão amplamente distribuídos na América Latina (WHO Expert Committee, 2002; Yamagata; Nakagawa, 2006). Entretanto, existem outras formas de transmissão: via oral, por meio da ingestão de alimentos contaminados; congênita, pela passagem de parasitos de mulheres infectadas para seus bebês durante a gravidez ou o parto; acidental, pelo contato de mucosas ou feridas com materiais contaminados; e por meio do transplante de órgãos ou da transfusão de sangue (De Sousa *et al.*, 2024).

A transmissão vetorial ocorre quando o inseto infectado, após realizar o repasto sanguíneo, defeca próximo ao local da picada, liberando formas tripomastigotas metacíclicos (Echeverria; Morillo, 2019). Ao coçar a região, ocorre a penetração do parasito pela pele lesionada ou por mucosas. Dessa forma, os tripomastigotas metacíclicos acessam a circulação

sanguínea (**Figura 1**). Uma vez na corrente sanguínea, o parasito invade principalmente células musculares, com um tropismo pelo coração, tecidos esplênicos e esôfago. No interior das células do hospedeiro, o parasito se diferencia na forma amastigota que se multiplica ativamente. Em seguida, as amastigotas se transformam em tripomastigotas, rompem a célula hospedeira e se disseminam pelo sistema circulatório e linfático, dando continuidade ao ciclo infeccioso. As tripomastigotas podem infectar novas células hospedeiras ou serem ingeridas por triatomíneos. Neste último caso, após o repasto sanguíneo, as tripomastigotas se diferenciam em epimastigotas no intestino médio do inseto. Ao alcançar a porção final do trato digestivo, as epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas capazes de infectar outros hospedeiros (Echeverria; Morillo, 2019).

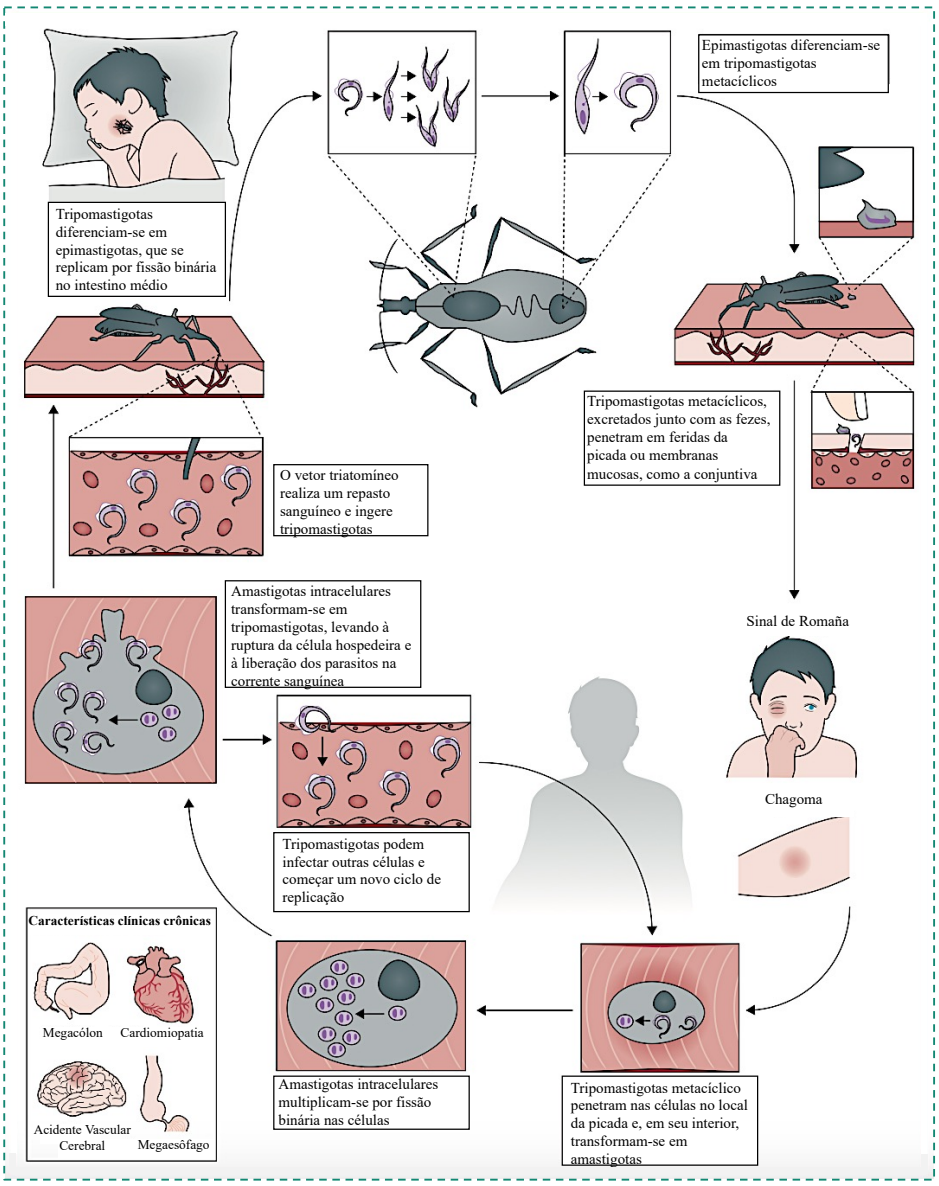


Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O ciclo começa quando o inseto triatomíneo ingere tripomastigotas de um hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do inseto, os parasitas

diferenciam-se em epimastigotas. Ao alcançarem o intestino posterior, as células de *T. cruzi* diferenciam-se novamente em tripomastigotas e são eliminadas junto com as fezes do inseto. Em seguida, os parasitas entram no organismo humano através da ferida da picada ou de mucosas e invadem células nucleadas, onde os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. Esses amastigotas se replicam até se transformarem novamente em tripomastigotas, rompendo as células do hospedeiro e sendo liberados na circulação sanguínea. Dessa forma, um inseto triatomíneo pode ingerir tripomastigotas durante um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo. Imagem adaptada de Pérez-Molina; Molina (2018).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases clínicas subsequentes: aguda e crônica. A fase aguda é assintomática e dura 4-8 semanas. Quando sintomática, os sinais mais comuns incluem febre, inflamação no local da picada, edema palpebral unilateral (sinal de Romaña), hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Echeverría *et al.*, 2020). Após a fase aguda, caso o indivíduo não receba tratamento adequado, a doença evolui para a fase crônica. Nessa fase, cerca de 70-80% das pessoas permanecem infectadas, mas assintomáticas por longos períodos, configurando a forma indeterminada da doença (Schijman, Alejandro Gabriel *et al.*, 2024). Entretanto, cerca de 20-30% dos indivíduos infectados progridem para manifestações clínicas, que podem envolver alterações digestivas, neurológicas ou cardíacas, sendo a cardiomiopatia a complicação mais prevalente nessa fase da doença (Echeverría *et al.*, 2020).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um protozoário flagelado diploide que apresenta alta diversidade genética e fenotípica intraespecífica. Variações no número e tamanho dos cromossomos homólogos (Branche *et al.*, 2006), bem como no tamanho do genoma (Lewis *et al.*, 2009) sugerem uma elevada plasticidade genômica (Zingales, Bianca, 2018). Além disso, apesar de ser um organismo que se replica por fissão binária (Tibayrenc; Ayala, 2002), evidências indicam que eventos de recombinação gênica ocorrem naturalmente (Gaunt *et al.*, 2003), contribuindo para a diversidade genética do parasito.

A população de *T.cruzi* é estruturada em seis grupos genéticos distintos, denominados *Discrete Typing Units* (DTUs) (Zingales, B *et al.*, 2009). A proposição destes grupos foi realizada a partir de padrões genéticos, bioquímicos e marcadores moleculares. Os grupos TcI e TcII consistem em linhagens ancestrais que deram origem à TcIII e TcIV por meio de eventos de hibridização (Westenberger *et al.*, 2006). Já TcV e TcVI são linhagens híbridas que possuem TcII e TcIII como linhagens parentais (Lewis *et al.*, 2011; Subileau *et al.*, 2009; Yeo *et al.*, 2011). Diversos estudos têm investigado possíveis associações entre as DTUs e manifestações clínicas, bem como a susceptibilidade ao tratamento (Poveda *et al.*, 2014; Rassi Jr; Rassi; Marin-Neto, 2009; Rodriguez *et al.*, 2014). Alguns trabalhos reportaram variações no tropismo tecidual de determinadas cepas (Mantilla *et al.*, 2010); contudo, não identificaram uma correlação entre a diversidade genética do parasito e manifestações clinicas da doença (Guhl;

Ramírez, 2013; Macedo; Pena, 1998). Da mesma forma, algumas pesquisas indicam variações na susceptibilidade a medicamentos entre cepas (Teston *et al.*, 2013; Toledo *et al.*, 2003). No entanto, apenas a diversidade genética é insuficiente para explicar as diferenças na resposta ao tratamento, sugerindo a influência de fatores adicionais no desfecho clínico (Silvestrini *et al.*, 2024).

Os fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são Benznidazol (Rochagan®) e Nifurtimox (Lampit®), ambos desenvolvidos há mais de 50 anos. O Benznidazol é um derivado do nitroimidazol (**Figura 2A**). A enzima nitroredutase tipo 1 converte este composto em produtos que se ligam à guanosina e prejudicam a formação de novas cadeias de DNA (Hall; Wilkinson, 2012). Já o Nifurtimox é um derivado do nitrofurano (**Figura 2B**). Este composto também é metabolizado por nitroredutases resultando em metabólitos citotóxicos (Docampo; Moreno; Stoppani, 1981).

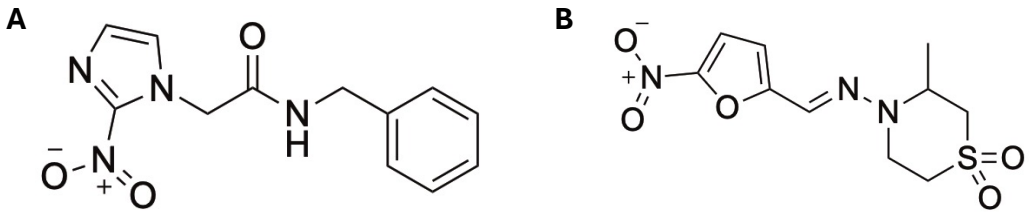


Figura 2 - Medicamentos aprovados para o tratamento da doença de Chagas: A) Benznidazol e B) Nifurtimox

A eficácia desses fármacos varia conforme a fase da doença, sendo mais efetivos na fase aguda. Para a doença congênita, o tratamento com benznidazol durante o primeiro ano de vida resultou em cura serológica para 100% dos indivíduos (Russomando *et al.*, 1998; Schijman, A. G., 2003). Já para aqueles que se encontravam na fase aguda da doença, observou-se cura serológica para cerca de 76% (Cançado, 1999). Por outro lado, na fase crônica a eficácia reduz expressivamente com taxas de cura entre 2-40% (Fabbro *et al.*, 2007; Viotti *et al.*, 2006). Vale ressaltar que o tratamento com estes fármacos exige a adesão do paciente por longos períodos, 60-90 dias, e está associada com efeitos adversos severos, como: anorexia, náuseas, vômitos e desordens neurológicas (Vallejo *et al.*, 2020). Portanto, é imprenscindivel o desenvolvimento de novos medicamentos com melhor eficácia e baixa toxicidade para o tratamento da doença de Chagas.

1.3 Cruzipaína

Neste contexto, estudos de biologia molecular do *T. cruzi* permitiram a identificação e validação de alvos para o desenvolvimento de fármacos (Duschak, 2019), bem como a proposição de três grupos de alvos. O grupo 1 consiste em macromoléculas essenciais para a

sobrevivência do parasito, como enzimas. O grupo 2 é composto por vias biológicas e enzimas chave relacionadas a estas vias. Por fim, organelas presentes no parasito compõem o grupo 3.

Diversos alvos pertencentes a esses grupos têm sido amplamente investigados. Dentre eles, podemos mencionar a via de biossíntese de esteróis. Nos mamíferos, o colesterol é o principal esterol de membrana, enquanto nos tripanossomatídeos, como *T. cruzi*, predomina o ergosterol. A dependência do parasita por essa via a torna um alvo estratégico para o desenvolvimento de fármacos seletivos. Nesse contexto, o posaconazol e o fosravuconazol foram avaliados em estudos pré-clínicos e clínicos, tanto isoladamente quanto em combinação com benznidazol, como opções para o tratamento da doença de Chagas (Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2017; Torrico *et al.*, 2021).

Entre as enzimas essenciais para *T. cruzi*, destacam-se as topoisomerases, que regulam o superenrolamento do DNA e são fundamentais para a replicação e transcrição; a trans-sialidase, que facilita a evasão imune do parasita ao transferir resíduos de ácido siálico dos glicoconjugados da célula hospedeira para sua superfície; e as proteases por desempenharem papéis cruciais em diversos processos biológicos do parasito.

Dentre esses alvos, as proteases e o proteassoma desempenham funções centrais na manutenção da homeostase celular. O proteassoma, responsável pela degradação de proteínas danificadas ou de vida curta, tem sido explorado como alvo terapêutico, com inibidores demonstrando boa potência e seletividade contra cinetoplastídeos (Khare *et al.*, 2016; Nagle *et al.*, 2020). As proteases, por sua vez, estão envolvidas em processos essenciais, como o controle da meia-vida de proteínas intracelulares e digestão de proteínas exógenas (Turk, 2006), tornando-se um alvo amplamente estudado no desenvolvimento de fármacos. A análise do genoma de *T .cruzi* sugere cerca de 400 possíveis proteases, sendo 250 metaloproteases, 70 cisteína-proteases, 40 serina-proteases, 25 treonina-proteases e 2 aspartil-proteases (Kosec; Alvarez; J. Cazzulo, 2006).

Identificada em 1989 (Cazzulo *et al.*, 1989; De A. Lima *et al.*, 1994; Eakin *et al.*, 1992), a cruzipaína (czp) consiste em uma das principais cisteíno proteases do *T. cruzi.* Esta enzima é expressa em todos os estágios de vida do parasito (Lima *et al.*, 2001) e está envolvida em processos importantes, como: metaciclogênese (Franke De Cazzulo *et al.*, 1994; Losinno *et al.*, 2021; Tomas; Miles; Kelly, 1997), invasão de células de mamíferos (Aparicio; Scharfstein; Lima, 2004), evasão da resposta imunológica por proteólise de anticorpos (Berasain *et al.*, 2003), ativação do fator de crescimento transformador beta (TGF-β) (Ferrão *et al.*, 2015),

degradação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB) (Burleigh; Woolsey, 2002; Doyle *et al.*, 2011), facilitando a persistência da infecção, degradação de componentes de matriz extracelular (Kemmerling; Bosco; Galanti, 2010), entre outros. Considerando a variedade de processos associados à czp, o desenvolvimento de inibidores desta enzima é uma estratégia amplamente explorada. Existem diversas classes de inibidores de czp descritas, como: nitrilas (Beaulieu *et al.*, 2010; Ndao *et al.*, 2014), alfa-cetoésters (Choe *et al.*, 2005), tiosemicarbazonas (Du *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2015), imidas (Ferreira et al., 2019), benzimidazóis (Ferreira et al., 2014; Pauli *et al.*, 2022), vinilsulfonas (Kerr *et al.*, 2009), aldeídos (Li *et al.*, 2021), aminoquinolinas (Braga *et al.*, 2017), análogos da galinamida A (Barbosa Da Silva *et al.*, 2022), quinazolinas (Barbosa Da Silva *et al.*, 2021), entre outras. Além disso, experimentos *in vitro* (Ashall; Angliker; Shaw, 1990; Franke De Cazzulo *et al.*, 1994; Meirelles *et al.*, 1992) e estudos em modelos animais (Engel *et al.*, 1998) reforçam a validação da czp como um alvo na busca por novos fármacos.

A czp é sintetizada no retículo endoplasmático do parasito como uma pró-proteína organizada em peptídeo sinal, pró-domínio, domínio catalítico e extensão C-terminal (**Figura 3A**) (Eakin *et al.*, 1992). O pró-domínio bloqueia o sítio ativo, entretanto em pH 5,5 ocorre uma clivagem do pró-domínio e auto-ativação da czp (**Figura 3B**) (Eakin *et al.*, 1992).

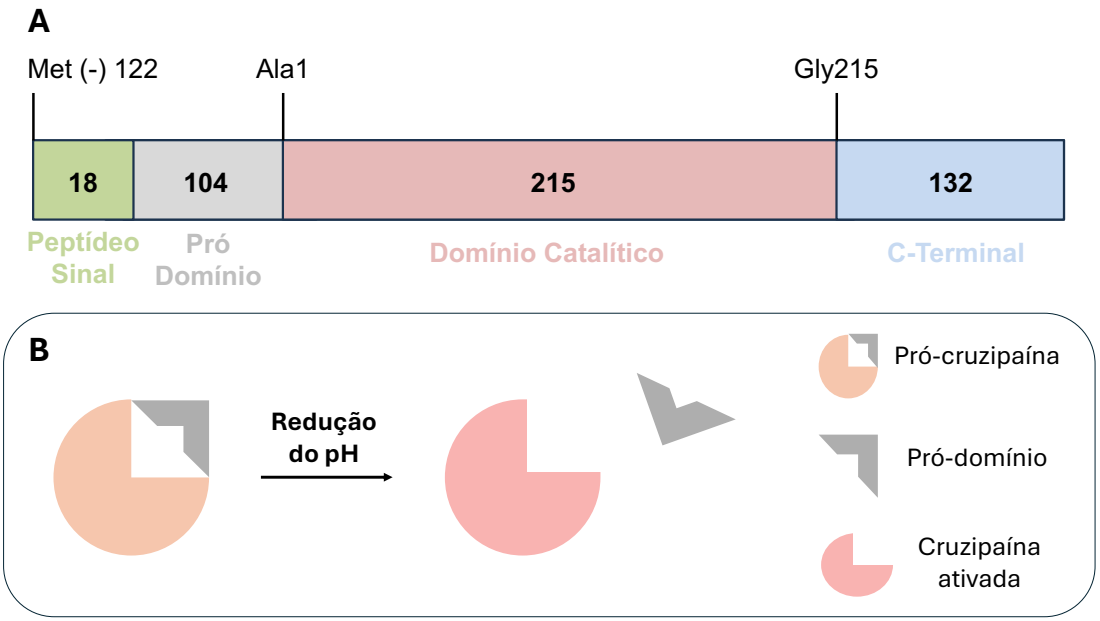


Figura 3 - Organização dos domínios das cruzipaínas e sua autoativação. A) Estão destacados os domínios encontrados na cruzipaína, bem como o número de resíduos que compõem cada um deles. B) Representação esquemática da autoativação da pró-cruzipaína. Apenas o domínio catalítico da pró-cruzipaína está representado na figura. Em pH baixo, próximo de 5,5, ocorre a clivagem do pró-domínio e liberação do sítio ativo.

Considerando que a czp é um alvo amplamente estudado, estão disponíveis diversas estruturas cristalográficas da forma recombinante, denominada cruzaína (Eakin *et al.*, 1992). Esta forma não possui a extensão C-terminal, o que favorece a cristalização (Eakin *et al.*, 1993; McGrath *et al.*, 1995). De modo geral, essas estruturas permitem compreender detalhes estruturais da cruzaína, bem como dos complexos cruzaína-inibidores.

A cruzipaína catalisa a hidrólise de ligações peptídicas e pode acomodar até 7 resíduos de aminoácidos do substrato no sítio ativo, cada um ocupando um subsítio. O sítio ativo das cruzipaínas pode ser dividido em subsítios nomeados de acordo com a definição de Schechter e Berger (Schechter; Berger, 1967). Os subsítios localizados no lado amino da ligação clivada são denominados S1 até S3, enquanto aqueles na região acil recebem S1`até S3`. Os subsítios S3, S2, S1 e S1`são os mais relevantes para os estudos de desenvolvimento de inibidores, pois compõem a principal região de reconhecimento e ligação dos substratos (**Figura 4**).

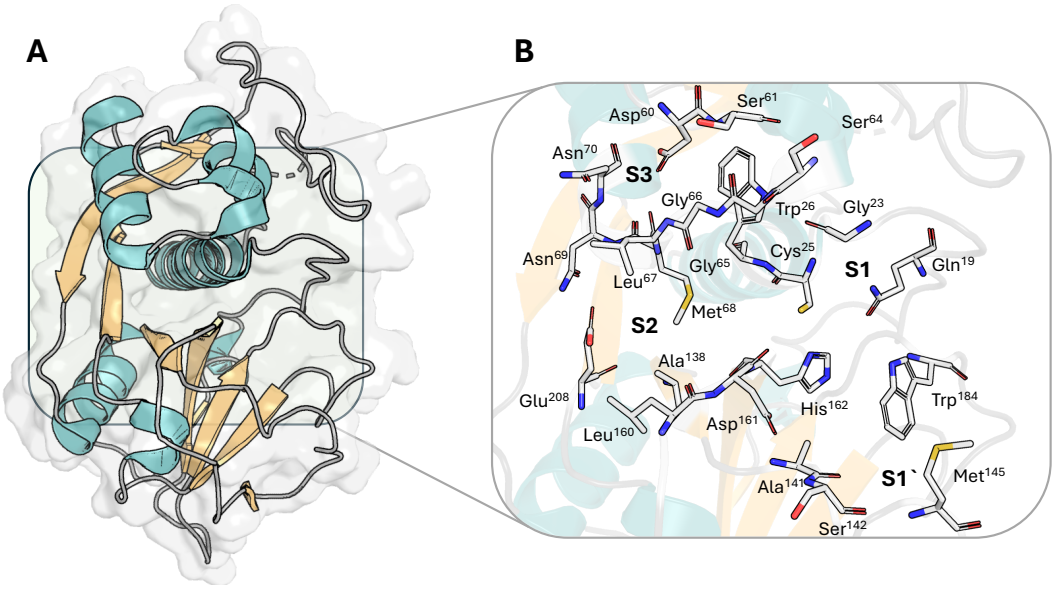


Figura 4 - Estrutura tridimensional da cruzaína e subsítios envolvidos no reconhecimento de ligantes. A) Estrutura da cruzaína obtida a partir do complexo PDB 3KKU, para o qual o inibidor não foi representado na figura. Alfa-hélices destacadas em verde, folhas beta em amarelo e loops em cinza escuro. A superfície da proteína está representada em cinza claro. B) Resíduos encontrados nos subsítios S3, S2, S1 e S1` representados como *stick*s.

Estudos de especificidade de substrato e relação estrutura-atividade (REA) contribuiram para a caracterização destes subsítios quanto a acomodação de diferentes grupos químicos. O subsítio S3 apresenta preferência por grupos carregados positivamente, como Lys e Arg (Choe *et al.*, 2006), além de grupos aromáticos volumosos (Gomes *et al.*, 2019). Alguns desses grupos contêm substituintes capazes de interagir com Ser61 (Cianni *et al.*, 2018).

O subsítio S2 demonstra afinidade por aminoácidos hidrofóbicos, como Phe, Leu e Val (Choe *et al.*, 2006; Del Nery *et al.*, 1997), favorecendo grupos aromáticos em relação à alifáticos (Choe *et al.*, 2006). Além disso, o S2 também pode acomodar grupos polares, como Arg e Tyr (Del Nery *et al.*, 1997). Neste contexto, o resíduo Glu208 desempenha um papel essencial: na presença de grupos polares no S2, Glu208 se orienta de maneira a estabelecer interações eletrostáticas ou ligações de hidrogênio com o aminoácido no subsítio (Gillmor; Craik; Fletterick, 1997). Por outro lado, quando resíduos hidrofóbicos ocupam o S2, Glu208 altera sua orientação em direção ao solvente, favorecendo a acomodação destes grupos (Gillmor; Craik; Fletterick, 1997). Já o subsítio S1 apresenta preferência por grupos carregados positivamente (Lys e Arg, por exemplo) (Choe *et al.*, 2006; Judice *et al.*, 2001), enquanto o subsítio S1` favorece a acomodação de grupos hidrofóbicos (Choe *et al.*, 2006).

Diversos estudos computacionais e experimentais foram conduzidos para elucidar o mecanismo de ação de cisteína-proteases em geral e das cruzipaínas (Arafet; Ferrer; Moliner, 2017; Arafet; Świderek; Moliner, 2018; Oanca *et al.*, 2020; Zhai; Meek, 2018), que pode ser descrito em algumas etapas. Inicialmente, o tiolato da Cys25 realiza um ataque nucleofílico ao carbono do grupo carbonila da ligação peptídica do substrato. Esse processo gera um intermediário instável tetraédrico, que subsequentemente reage com a His162, resultando na formação de um intermediário covalente. Em seguida, ocorre a hidrólise desse intermediário, mediada por um ataque nucleofílico de uma molécula de água, cuja ativação é facilitada por His162. Esse processo resulta na deacetilação de Cys25, culminando na liberação dos produtos da clivagem e finalizando o ciclo.

1.3.1 Desenvolvimento de inibidores da cruzaína

A busca por inibidores da cruzaína tem sido amplamente explorada nas últimas décadas. Na base de estruturas Protein Data Bank (PDB) estão disponíveis 29 estruturas cristalográficas cruzaína-inibidor, as quais fornecem informações essenciais para a descoberta de novos compostos. Além disso, diversas classes já foram descritas, incluindo inibidores peptídicose não peptídicos, bem como covalentes ou não covalentes.

Os inibidores covalentes podem ser classificados como irreversíveis, quando formam uma ligação estável e permanente com o tiolato da Cys25, ou reversíveis, quando a interação covalente pode ser revertida. Já os inibidores não covalentes interagem com a cruzaína por interações intermoleculares, como ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, não havendo formação de ligação covalente. Nesse contexto, existem diversos inibidores descritos

que pertencem a estes grupos. Considerando a vasta literatura disponível e os numerosos estudos que descrevem inibidores, a seguir serão apresentados e discutidos apenas alguns exemplos representativos.

1.3.1.1 Inibidores peptídicos

Os inibidores peptídicos são formados, em geral, por sequências curtas de aminoácidos (normalmente dois a três), que podem ser naturais ou modificados, conjugados a um grupo eletrofílico (**Figura 5A**) (Brinen *et al.*, 2000).

Dentre os inibidores peptídicos irreversíveis contra a cruzaína, destacam-se compostos contendo grupos eletrofílicos como vinilsulfonas (Brinen *et al.*, 2000), epóxicetonas (Roush *et al.*, 1998), epoxiésteres (González *et al.*, 2007), fluormetilcetonas (Harth *et al.*, 1993) e diazometilcetonas (Franke De Cazzulo *et al.*, 1994). A presença desses grupos permite a interação covalente com a enzima, mecanismo que pode ser exemplificado pelo inibidor da classe das vinilsulfonas, K11777 (Kerr *et al.*, 2009) (**Figura 5A**).

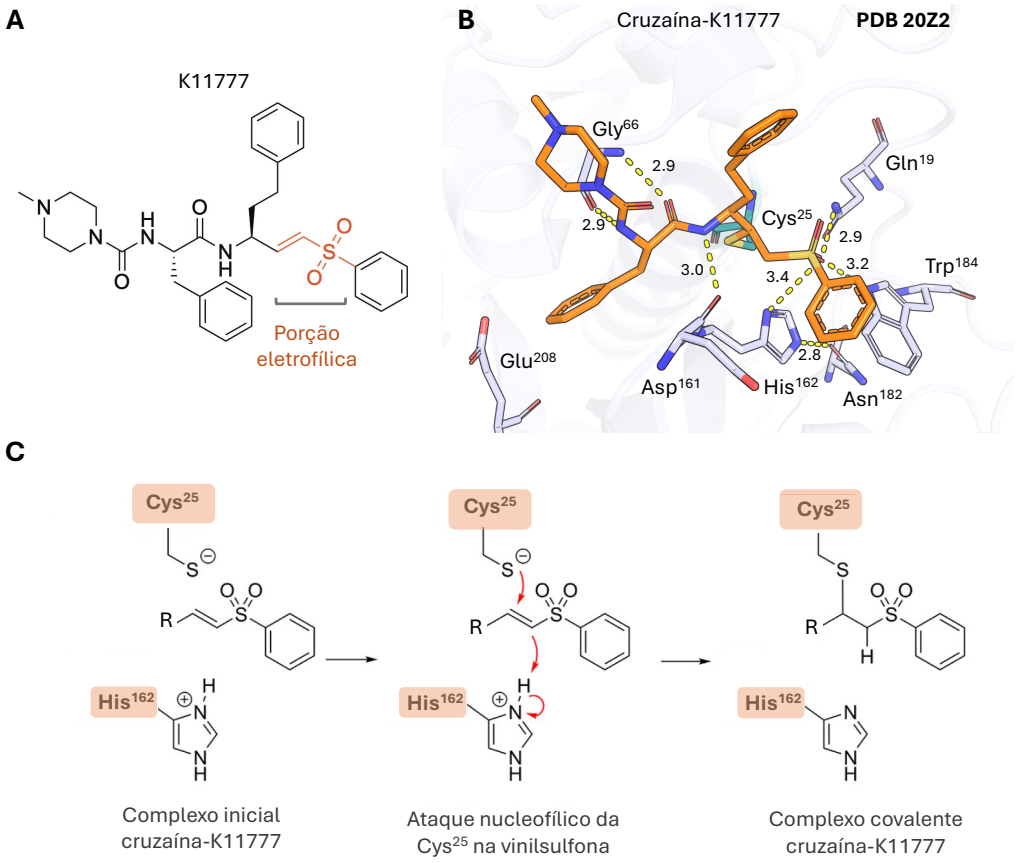


Figura 5 – Vinilsulfona K11777 e mecanismo de inibição da cruzaína por ligação covalente com este inibidor. A) Estrutura típica de um inibidor peptídico da cruzaína, representado pelo K11777. Porção eletrofílica destacada em vermelho. B) Complexo cristalográfico cruzaína-K11777, PDB 2OZ2. C) Mecanismo de inibição da cruzaína pelo composto K11777. Figura adaptada de Jasinski; Martini; Moglioni (2024)

A inibição da cruzaína pelo K11777 ocorre através de uma reação de adição de Michael (**Figura 5C**). Esse tipo de reação consiste na adição de um nucleófilo ao carbono β de um alceno conjugado a um grupo eletrofílico, sendo os alcenos denominados aceptores de Michael. O ataque nucleofílico da Cys25 ocorre associado à captura de um próton do grupo imidazol da His162, resultando na formação de uma ligação covalente estável entre a enzima e o inibidor (**Figura 5B**) (Silva *et al.*, 2020).

O composto K11777 foi considerado um dos inibidores de cruzaína mais promissores, apresentando efetividade em testes *in vitro* e em modelos animais (Doyle *et al.*, 2007; Engel *et al.*, 1998). Entretanto, avaliações posteriores indicaram baixa tolerância em primatas e cães, possivelmente associados a características farmacocinéticas desfavoráveis, resultando na descontinuidade dos estudos (K777 (Chagas), 2014).

Diante dessas limitações, o desenvolvimento de inibidores peptídicos reversíveis também foi explorado com o objetivo de reduzir potenciais efeitos adversos associados à interação com proteínas inespecíficas (Bandyopadhyay; Gao, 2016; Choy *et al.*, 2013). Nesse contexto, podemos destacar o desenvolvimento da vinilsulfona WRR-669 (Jones *et al.*, 2016), α-cetoésteres AQ581332 e α-cetoamidas AQ903084 (Choe *et al.*, 2005) e as dipeptidil nitrilas Cz-007 e Cz-008 (Ndao *et al.*, 2014). O desenvolvimento das nitrilas mencionadas por Ndao e colab. (2014) partiu da avaliação de compostos relacionados ao inibidor de catepsina K, odanacatibe, contra a cruzaína (**Figura 6A**). Considerando a similaridade com as catepsinas humanas, os autores avaliaram uma biblioteca de nitrilas contra a cruzaína e identificaram dois análogos, Cz-008 e Cz-007 com IC_{50} de 0.0018 μM e 0.001 μM, respectivamente (**Figura 6B** e **C**). Estes inibidores apresentaram eficácia em modelos com animais com taxas de cura de 70 (CZ-008) e 90% (CZ-007). Entretanto, observaram uma baixa biodisponibilidade e meia vida tornando necessário a otimização destes posteriormente.

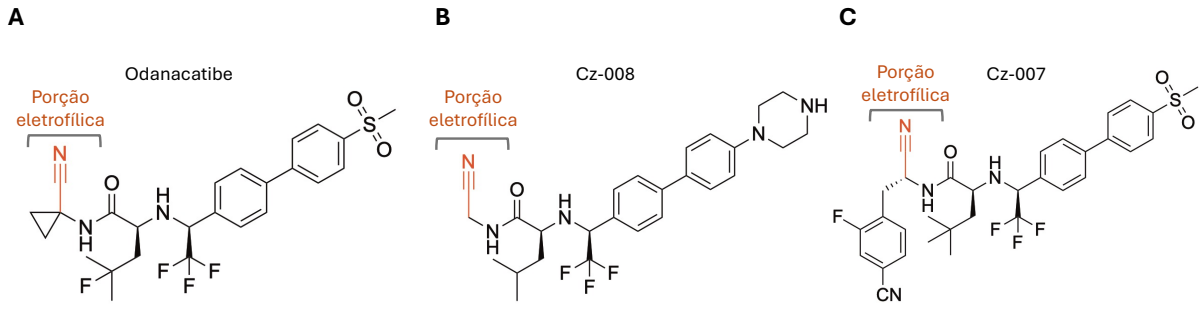


Figura 6 – Desenvolvimento de inibidores peptídicos da cruzaína baseado no odanacatibe. A) Estrutura química do inibidor de catepsina K, odanacatibe. B) Inibidor Cz-008 e C) Inibidor Cz-007. Porção eletrofílica destacada em vermelho. Figura adaptada de Jasinski; Martini; Moglioni (2024)

Outros inibidores reversíveis mencionados, como o α-cetoéster (AQ581332) e a α-cetoamidas (AQ903084), também foram desenvolvidos (Choe *et al.*, 2005). Entretanto, observou-se uma baixa efetividade *in vivo*, possivelmente devido à reduzida permeabilidade celular e consequente menor biodisponibilidade (Choe *et al.*, 2005).

1.3.1.2 Inibidores não peptídicos

Os inibidores peptídicos apresentam algumas limitações relevantes, como baixa permeabilidade à membrana celular e baixa estabilidade *in vivo* (Wang, Lei *et al.*, 2022). A permeabilidade está associada a fatores como o tamanho e composição de aminoácidos. Em geral, atravessar a membrana celular representa um grande desafio para este tipo de inibidores, o que pode limitar as suas aplicações. Os peptídeos também podem possuir baixa estabilidade *in vivo* devido à ausência de estruturas secundárias e terciárias, bem como a exposição a hidrólise por enzimas. Essa característica resulta em instabilidade, com uma menor meia vida e uma eliminação mais rápida (Diao; Meibohm, 2013). Portanto, o desenvolvimento de inibidores não peptídicos se tornou uma estratégia amplamente explorada resultando em inibidores de diversas classes, irreversíveis ou reversíveis.

Como exemplo de inibidor não peptídico irreversível, podemos mencionar o trabalho de Brak e colab. (2008). Inicialmente, a partir da técnica de *substrate activity screening* (SAS), os pesquisadores identificaram fragmentos com alta afinidade contra a cruzaína. Posteriormente, inibidores foram desenvolvidos a partir da incorporação dos grupos α-(ariloximetil) cetonas e α-(aciloximetil) cetonas (**Figura 7A** e **B**). Estes são grupos eletrofílicos capazes de interagir com o tiolato da Cys25 resultando na formação de uma ligação covalente cruzaína-inibidor (**Figura 7C**). Em outro estudo análogos destes compostos foram desenvolvidos, com um dos inibidores apresentando boa potência contra a cruzaína e o parasito (IC_{50} de 0,003 μM contra cruzaína e amastigotas de *T. cruzi*, respectivamente), bem como eliminação dos parasitos em um modelo animal e baixa citotoxicidade (Neitz *et al.*, 2015).

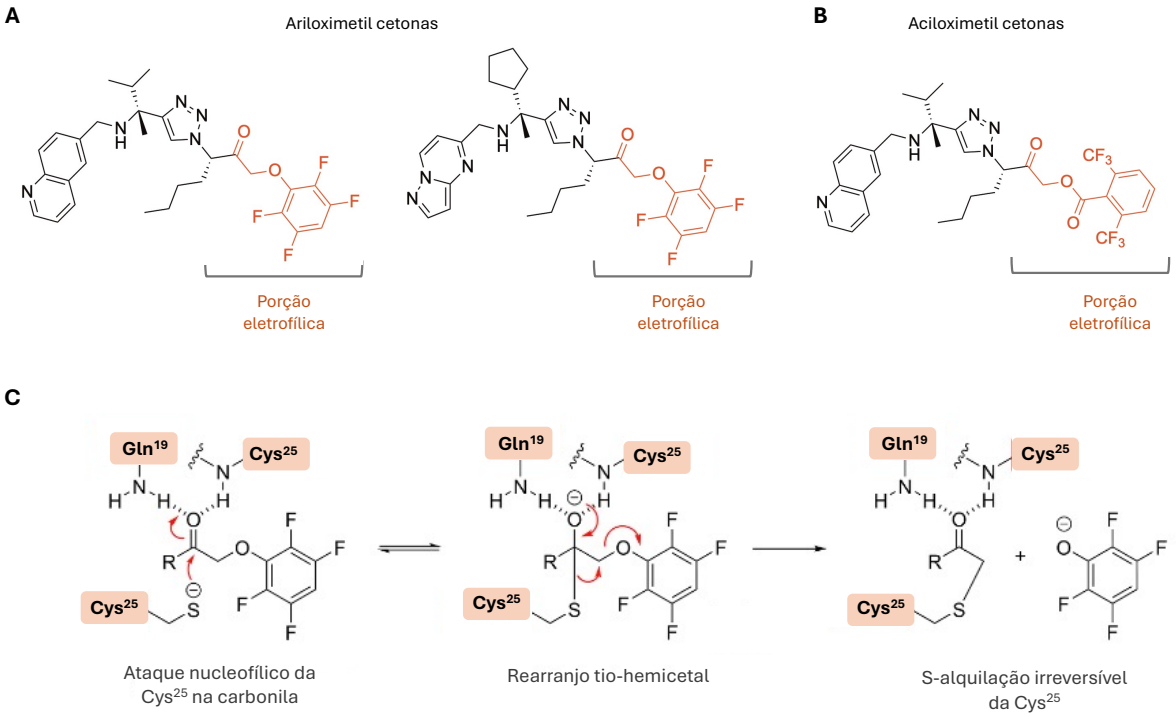


Figura 7 – Exemplo de inibidores não peptídicos irreversíveis da cruzaína. A) Estrutura química de inibidores pertencentes a classe da ariloximetil cetona e B) aceiloximetil cetona. C) Mecanismo de ação destes compostos contra a cruzaína. Porção eletrofílica destacada em vermelho. Figura adaptada de Jasinski; Martini; Moglioni, (2024)

Com relação a outras classes de inibidores não peptídicos podemos mencionar: hidrazonas, tiosemicarbazonas, nitrilas, aminoquinolinas, benzimidazóis entre outras. No trabalho realizado por Ferreira e colab. (2010), a aplicação de ferramentas computacionais e técnicas experimentais resultaram no desenvolvimento de um potente inibidor benzimidazólico. Inicialmente, uma combinação entre triagem experimental em larga escala e triagem virtual de compostos resultou na identificação de um derivado benzimidazólico com K_i de 800 nM contra a cruzaína (Ferreira et al., 2010) (**Figura 8A**). A obtenção da estrutura cristalográfica cruzaína-inibidor permitiu observar ligações de hidrogênio entre a amida do composto e a cadeia principal de Gly66 e Asp161 (**Figura 8B**). Além disso, observou-se a ocupação do subsítio S2 pelo bromofenil e ligações de hidrogênio entre benzimidazol e a água. As informações obtidas foram essenciais para guiar a otimização deste inibidor. Mais de 40 análogos foram sintetizados resultando na compreensão da relação estrutura-atividade e o desenvolvimento de um novo inibidor mais potente (**Figura 8C**, K_i de 82 nM) e com atividade tripanocida (Ferreira et al., 2014).

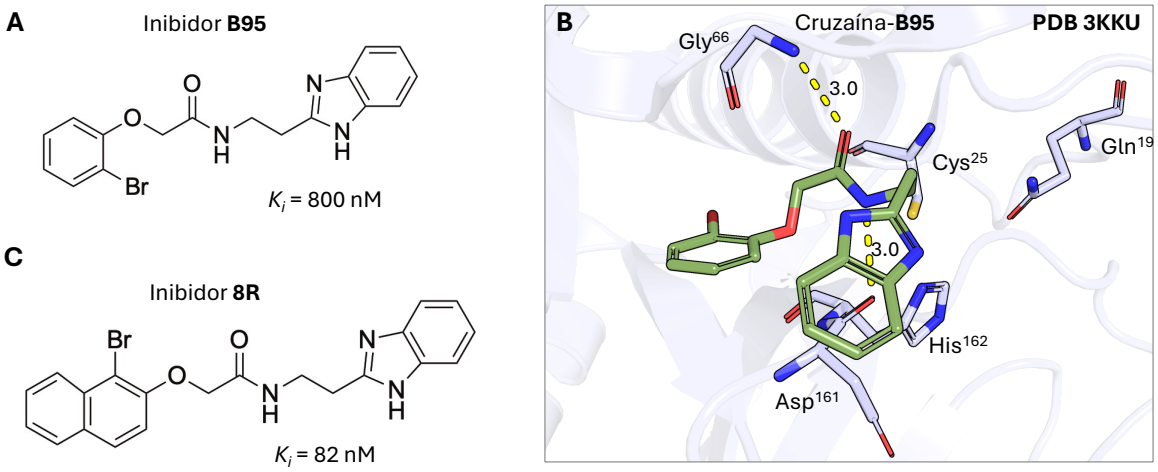


Figura 8 – Inibidores não peptídicos contra a cruzaína. A) Inibidor competitivo da cruzaína (B95). B) Estrutura cristalográfica cruzaína-B95 com ligações polares representadas por linhas tracejadas amarela. C) Composto otimizado a partir de B95.

Portanto, a partir dos exemplos mencionados fica evidente a diversidade de classes químicas dos inibidores da cruzaína, sejam eles peptídicos ou não peptídicos.

1.4 Subtipos de cruzipaínas

Comumente, a literatura científica refere-se apenas à cruzipaína ou cruzaína, o que pode resultar na interpretação equivocada de que se trata de uma única enzima. No entanto, diversos subtipos de cruzipaína já foram identificados e caracterizados. A forma clássica e mais amplamente estudada foi descrita inicialmente em 1990 (Cazzulo *et al.*, 1989; De A. Lima *et al.*, 1994; Eakin *et al.*, 1992) e atualmente é denominada cruzipaína 1 (czp1). Alguns anos depois foi identificado um segundo subtipo, denominada cruzipaína 2 (czp2) (Lima *et al.*, 2001)

Os subtipos czp1 e czp2 apresentam diferenças em suas interações com substratos e inibidores. Em particular, a czp2 exibe menor sensibilidade ao inibidor E-64 e apresenta uma especificidade distinta para substratos, especialmente no subsítio S2, onde apresenta preferência por resíduos alifáticos. Além disso, variações na sensibilidade à cistatina C foram reportadas, sugerindo que esse inibidor apresenta menor eficácia contra a czp2. Da mesma forma, observou-se uma resposta reduzida desse subtipo à modulação pelo sulfato de heparina (Lima *et al.*, 2002).

No estudo conduzido por Santos e colab. (2021), foram implementadas análises filogenéticas, genômicas, transcriptômicas e estruturais para analisar as sequências de cruzipaína de parasitos pertencentes a três linhagens: TcI (Dm28c), TcII (YC6) e TcVI (CL Brener). Foi proposto a divisão das cruzipaínas em duas famílias. A família I é formada por czp1 (cruzaína), enquanto a família II é formada por três subtipos. As sequências da família II

são mais diversas do que as da família I, sugerindo que cópias idênticas de czp1 na família I podem ter surgido para aumentar os níveis de expressão deste subtipo. Por outro lado, a diversidade da família II pode estar associada ao aumento do repertório enzimático do parasito, com cada subtipo possivelmente exercendo funções biológicas distintas (Santos *et al.*, 2021).

Estudos demonstram diferentes níveis de expressão dos subtipos a depender da forma de vida do parasito. De A. Lima e colab. (1994) identificaram mRNA pertencente à família II de cruzipaínas para tripomastigotas e amastigotas, e apenas mRNA da família I em epimastigotas da linhagem Dm28c. Análises de dados obtidos por RNA-seq para a linhagem CL Brener indicam uma maior expressão de cruzipaínas da família II em tripomastigotas (Santos *et al.*, 2021). Essas diferenças quanto a expressão dos subtipos de cruzipaína podem estar relacionadas com funções biológicas exercidas nas diferentes formas de vida do parasito. Além disso, diferentes cópias de cruzipaínas podem ser importantes para a geração de resistência natural a inibidores. Por exemplo, como mencionado anteriormente, czp 2 apresenta maior resistência a inibição por cistatinas quando comparada a czp1 (Lima *et al.*, 2002).

Santos e colab. (2021) conduziram uma análise detalhada das substituições presentes no domínio catalítico das diferentes sequências de cruzipaína. Inicialmente, a partir de estruturas cristalográficas da cruzaína (czp1) complexada com inibidores, foram identificados os resíduos que interagem frequentemente com os inibidores. Posteriormente, foi investigado quais os aminoácidos que ocupam estas posições ao longo das diversas sequências de cruzipaínas (**Tabela 1**). Com base nessa comparação, os autores propuseram a subdivisão da família II em três subtipos: cruzipaína 2, cruzipaína 3 e cruzipaína 4.

Tabela 1 - Substituições de aminoácidos no sítio ativo das cruzipaínas e frequência de interações de cada posição com ligantes da cruzaína (czp1).

Subtipo de Cruzipaína (Czp)	**Resíduo**												
	S3		S2						S1	S1'			S2'/S1'
Czp1	S61	N70	L67	M68	N69	A138	G163	E208	S64	S142	M145	D161	Q159
Czp2	F	K	S	S	L	A	A	E	G	T	M	N	R
Czp3.7	F	K	W	P	L	T	A	E	G	T	I	S	T
Czp3.9	S	V	W	P	L	V	A	E	G	S	I	S	Q
Czp4	S	V	S	P	L	A	A	G	G	S	M	D	K
Frequência de interação com ligantes cristalográficos (%)	0	0	79,2	70,8	0	83,3	0	41,7	3	0	29,2	50	4,2

Ao todo, 13 posições na região do sítio ativo que possuem variações entre as cruzipaínas foram avaliadas. No subsítio S3 temos a mudança de Ser61 (czp1) para Phe (czp2 e

czp3.II.7_esmo) e Asn70 (czp1) para Lys (czp2 e czp3.II.7_esmo) ou Val (czp3.II.9_non-esmo e czp4) (**Figura 9A**, **C**). Essas substituições afetam a polaridade e o volume do S3, tornando a cavidade carregada positivamente e mais bem definida para as cruzipaínas 2 e 3.II.7_esmo. O subsítio S1 é similar em todos os subtipos e a única mudança é a substituição de Ser64 da czp1 por Gly64 nas outras cruzipaínas (**Figura 9B**).

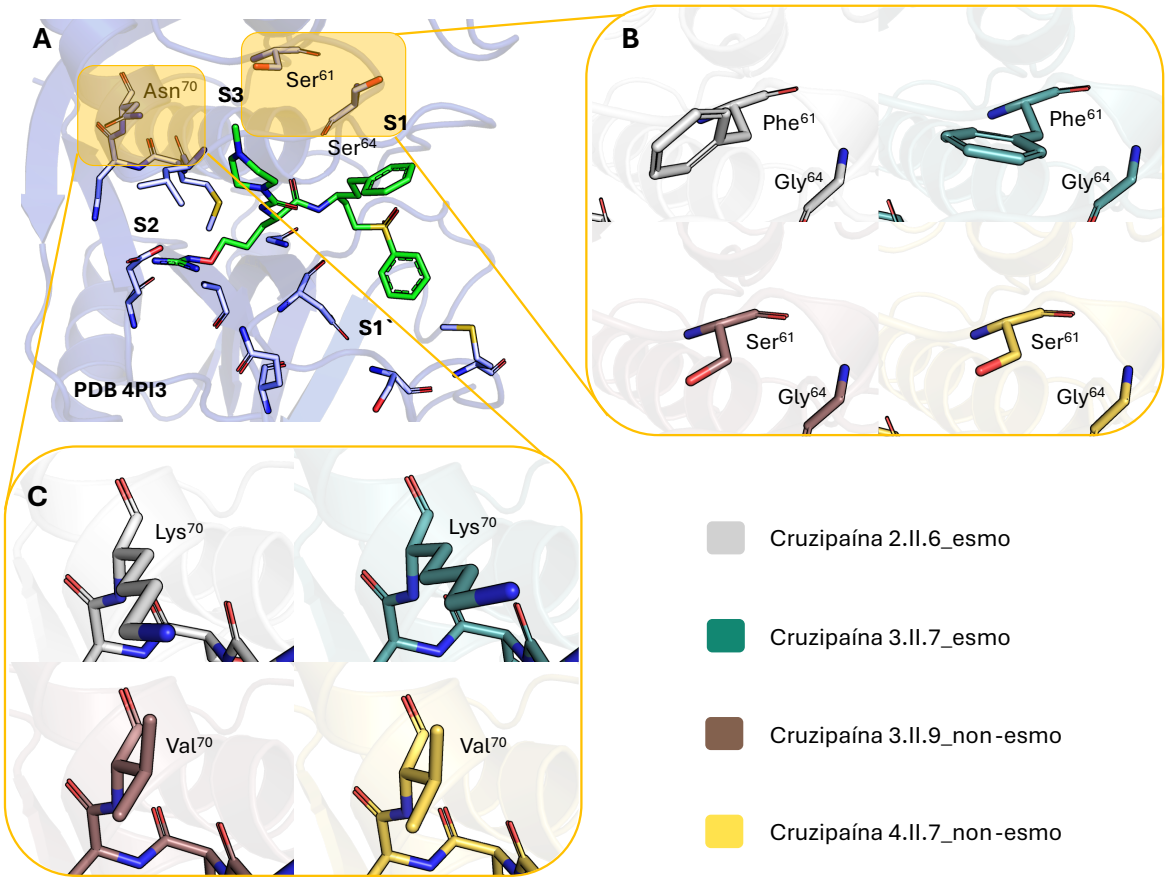


Figura 9 - Principais substituições encontradas nos subsítios S3 e S1 das cruzipaínas. A) Complexo cruzaína-inibidor com principais resíduos que são substituídos nas cruzipaínas representados em *sticks* na czp1. B) Cadeia lateral dos resíduos que ocupam as posições 61, 64 e C) 70 destacadas em *stick* nas cruzipaínas.

O subsítio S2 é o mais bem definido e essencial para a seletividade e reconhecimento de ligantes (Gillmor; Craik; Fletterick, 1997; McGrath *et al.*, 1995). Grande parte dos resíduos que interagem com ligantes em estruturas cristalográficas estão neste subsítio. Dentre estes resíduos, existem diferenças entre as cruzipaínas nas posições 67, 68 e 208. Comparada à czp1, que possui Leu67 e Met68, a czp2 possui um S2 maior e mais polar devido a presença de Ser67 e Ser68 (**Figura 10A**, **B**) (Santos et al., 2025).

Por outro lado, as duas czp3 possuem um S2 menor que os outros subtipos devido a presença de Trp67 e Pro68, bem como a substituição de Ala138 por Thr e Val (czp3.II.7 e czp3.II.9, respectivamente) (**Figura 10A**, **B**). O resíduo Glu208 presente no subsítio S2 é

essencial para a acomodação de grupos hidrofóbicos ou carregados positivamente na czp 1 (Gillmor; Craik; Fletterick, 1997). Este resíduo é substituído por uma glicina apenas na czp 4, o que torna o S2 mais raso e exposto neste subtipo (**Figura 10A**, **B**).

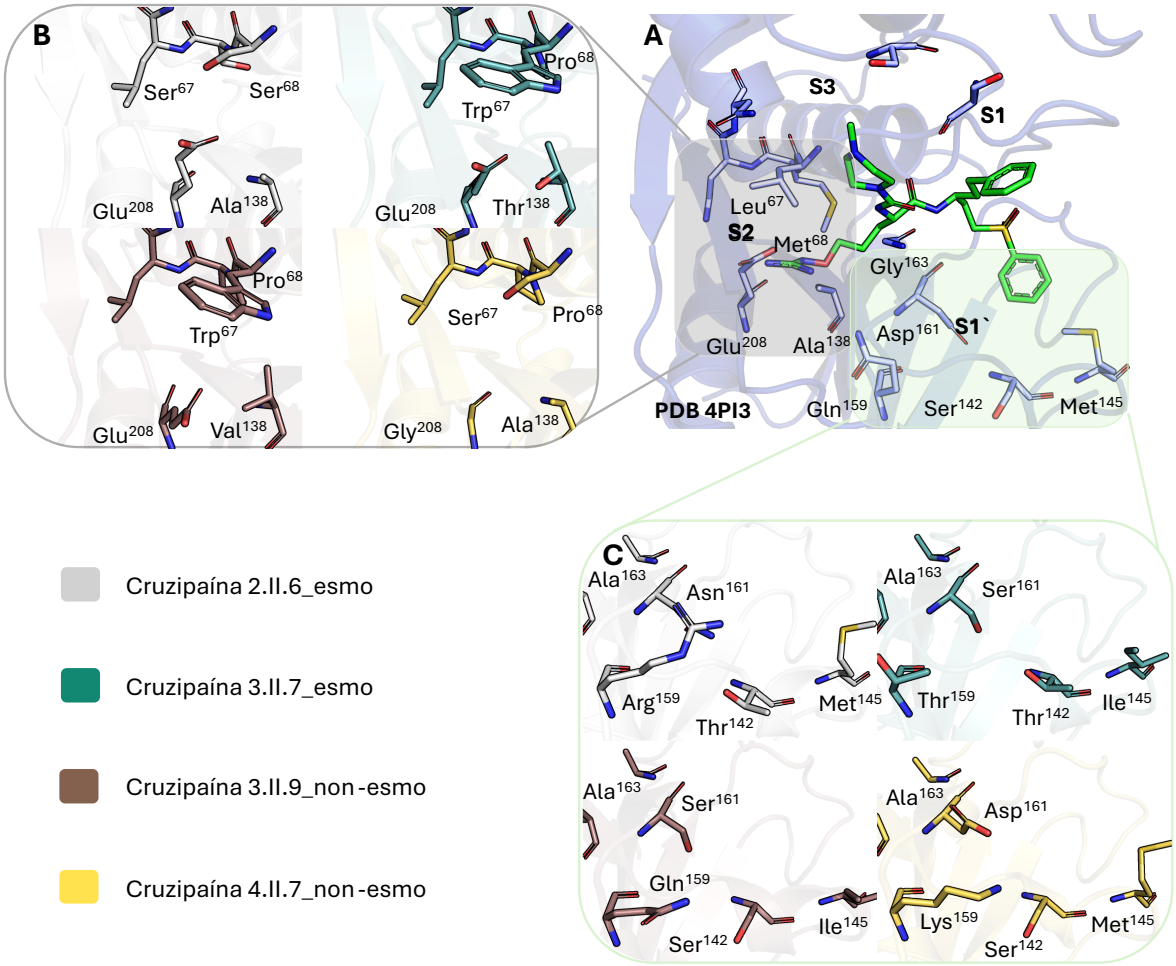


Figura 10 - Principais substituições encontradas nos subsítios S2 e S1' das cruzipaínas. A) Complexo cruzaína-inibidor com principais resíduos que são substituídos nas cruzipaínas representados em *sticks. B)* Cadeia lateral dos resíduos que ocupam as posições 67, 68, 208, 138, C) 142, 145, 159, 161 e 163 representadas em *sticks.*

Com relação ao subsítio S1`, as modificações impactam o volume e carga. Czp1 e czp4 possuem Asp161 que realiza ligações de hidrogênio com ligantes nas estruturas cristalográficas da czp1 e fornece um caráter negativo ao S1` (**Figura 10C**, **B**). Nesta mesma posição, as cruzipaínas 2 e 3 possuem resíduos polares neutros (Asn e Ser, respectivamente). Na posição 142 observa-se uma substituição conservadora, Ser142 (para czp1, czp3.II.9 e czp4) ou Thr142 (para czp2 e czp3.II.7). Já na posição 145 temos Met145 que é substituída por Ile145 nas cruzipaínas 3 (**Figura 10C**, **B**). Além disso, observa-se diferenças na posição 159. Na czp 1 e czp3 há resíduos polares não carregados (Gln159 para czp1 e czp3.II.9, Thr159 para czp3.II.7), enquanto as cruzipaínas 2 e 4 possuem os resíduos básicos, Arg159 e Lys169 respectivamente (**Figura 10C**, **B**).

Portanto, a análise dos sítios ativos das cruzipaínas permite destacar duas observações principais. A conservação de diversos resíduos entre os subtipos sugere que o desenvolvimento de inibidores com ação sobre os quatro subtipos de cruzipaína é uma possibilidade viável. No entanto, a presença de substituições específicas no sítio ativo pode influenciar as interações entre as cruzipaínas e os inibidores, resultando em variações na afinidade ou até mesmo em seletividade entre os subtipos. Diante disso, a avaliação do perfil de inibição de compostos desenvolvidos para a cruzaína (czp1) frente aos demais subtipos constitui um passo essencial para a otimização de novos inibidores com maior eficácia contra *T. cruzi*.

1.5 Desenvolvimento racional de fármacos

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo complexo, custoso e de longa duração. Desde a identificação de um composto promissor (*lead*) até sua aprovação final para comercialização, pode-se levar aproximadamente 15 anos, com custos estimados em torno de 2 bilhões de dólares (Chang *et al.*, 2022). Além disso, a taxa de insucesso ao longo desse percurso é elevada, com cerca de 90% dos candidatos falhando nos ensaios clínicos (Sun *et al.*, 2022). Parte dessas falhas está associada a deficiências nas etapas iniciais, como a validação inadequada do alvo terapêutico ou a seleção de compostos com propriedades subótimas.

O processo de desenvolvimento de fármacos compreende diversas etapas, que frequentemente combinam abordagens experimentais e computacionais. A primeira fase, denominada pré-descoberta, tem como objetivo a compreensão da doença, seus mecanismos fisiopatológicos e a identificação de potenciais alvos terapêuticos (Hefti, 2008). Uma vez identificado e validado um alvo, busca-se encontrar moléculas capazes de modular sua atividade, promovendo alívio dos sintomas ou restauração da condição saudável do paciente. Essa etapa caracteriza o descobrimento de fármacos e os estudos pré-clínicos, nos quais os compostos selecionados são testados em modelos animais para avaliar segurança e eficácia, permitindo a escolha de um candidato a fármaco.

Após essa seleção, inicia-se a fase dos ensaios clínicos, na qual a eficácia e a segurança do candidato são avaliadas em seres humanos. Uma vez concluídos com sucesso, os dados são submetidos às agências regulatórias, que decidem sobre a aprovação do medicamento para comercialização (Kandi; Vadakedath, 2023). Mesmo após a liberação, o fármaco continua sendo monitorado na chamada farmacovigilância (também conhecida como fase 4 dos ensaios clínicos), etapa essencial para a detecção de potenciais efeitos adversos de longo prazo.

As ferramentas computacionais desempenham um papel fundamental, especialmente nas etapas iniciais, ao contribuir para a identificação e otimização de compostos. Além disso, seu uso permite a redução de custos e é frequentemente combinado com técnicas experimentais, tornando a abordagem mais eficiente e integrada.

1.5.1 Abordagens computacionais aplicados ao desenvolvimento de fármacos

As abordagens computacionais podem ser classificadas em duas categorias principais: baseadas em ligante e baseadas em estrutura. Os métodos baseados em ligante partem do pressuposto de que moléculas estruturalmente similares tendem a apresentar atividades biológicas semelhantes (Ferreira, Leonardo *et al.*, 2015). Essas abordagens utilizam bancos de dados de compostos conhecidos para inferir a atividade de novas moléculas, por meio de técnicas como *fingerprints* moleculares (representação binária da estrutura química) e modelos farmacofóricos (descrição tridimensional dos grupos químicos essenciais para a atividade) (Cereto-Massagué *et al.*, 2015). A vantagem dessas metodologias reside no baixo custo computacional e na possibilidade de serem aplicadas mesmo na ausência da estrutura do alvo.

Os métodos baseados em estrutura utilizam informações tridimensionais do alvo molecular para prever interações com potenciais ligantes. A estrutura da proteína pode ser obtida experimentalmente por cristalografia de raios X, cryo-EM (*Cryo-Electron Microscopy*) ou ressonância magnética nuclear. Na ausência de dados experimentais, modelos estruturais podem ser gerados por modelagem comparativa, que infere a estrutura com base em proteínas homólogas previamente caracterizadas, ou por outras metodologias de predição de estruturas de proteínas. Com base na estrutura do alvo, é possível empregar técnicas como *docking* molecular e simulações de dinâmica molecular para avaliar as interações com diferentes compostos e identificar aqueles com potencial atividade biológica contra o alvo.

Os programas têm como objetivos identificar o modo de ligação mais favorável para um complexo receptor-ligante e estimar a energia de interação proteína-ligante (Śledź; Caflisch, 2018). O receptor pode ser um ácido nucleico, como DNA ou RNA, ou uma proteína, enquanto o ligante pode ser uma pequena molécula, peptídeo ou outra proteína (Brooijmans; Kuntz, 2003). Em geral, esses programas posicionam as pequenas moléculas no sítio ativo, gerando diversos modos de ligação, também chamados de *poses*. Em seguida, uma função de pontuação é aplicada para avaliar essas *poses* e determinar o modo de ligação potencialmente mais favorável.

A amostragem de modos de ligação é realizada por algoritmos de busca conformacional, que podem ser classificados em determinísticos, estocásticos e sistemáticos. No método determinístico, a orientação e conformação da molécula em cada iteração são definidas com base no estado anterior, garantindo que o novo estado tenha energia igual ou inferior ao anterior (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014). Alguns exemplos de métodos determinísticos incluem minimização de energia e dinâmica molecular.

Os métodos estocásticos realizam mudanças aleatórias nos graus de liberdade do ligante, permitindo a exploração de diferentes soluções. No entanto, isso implica que resultados distintos podem ser obtidos a partir de um mesmo estado inicial. Dessa forma, como não há garantia de convergência dos resultados, frequentemente são realizadas várias execuções independentes do algoritmo (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014). Alguns dos métodos estocásticos mais utilizados incluem o método de Monte Carlo e os algoritmos genéticos.

O método sistemático explora os graus de liberdade do composto e pode ser subdividido em abordagens exaustivas, conjuntos conformacionais e construção incremental (*anchor and grow).* Na abordagem incremental utilizada pelo programa DOCK 6 (Allen *et al.*, 2015), o ligante flexível é dividido em um conjunto de segmentos rígidos conectados por ligações rotacionáveis. Alguns dos maiores segmentos, chamados de âncoras, são orientados no sítio ativo com base em esferas previamente geradas durante a preparação do *docking.* Em seguida, os segmentos são adicionados à âncora até que o ligante seja reconstruído na cavidade. A vantagem dessa abordagem é que a conformação interna do ligante permanece dentro das restrições do sítio ativo, reduzindo o espaço conformacional amostrado.

Após a geração de diferentes conformações, funções de pontuação são aplicadas para ranquear os modos de ligação mais favoráveis. Essas funções podem ser divididas em três tipos: empíricas, baseadas em conhecimento e físico-químicas (ou baseadas em campo de força).

As funções empíricas são desenvolvidas para reproduzir dados experimentais de afinidade para complexos receptor-ligante, com base na ideia de que é possível correlacionar a energia livre de ligação a um conjunto de variáveis não relacionadas. (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014). Já as funções baseadas em conhecimento são fundamentadas em análises estatísticas da frequência de interações entre os pares de átomos dos complexos receptor-ligante, determinadas experimentalmente (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014).Por fim, as funções físico-químicas consistem na soma da energia de diferentes termos. A energia potencial calculada geralmente considera termos ligados (como comprimento de ligação, ângulos e

diédricos) e não ligados (como interações van der Waals e eletrostáticas). No entanto, esses tipos de função não levam em consideração efeitos de solvatação e termos entrópicos (Guedes; De Magalhães; Dardenne, 2014).

No programa Dock 6, utilizado neste trabalho, o método de busca empregado é o *anchor and grow*, descrito anteriormente. Dentre as funções disponíveis, utilizamos a função físico-química denominada *Grid Score* (Equação 1), que possui dois componentes: $E_{_grid} = E_{_vdW} + E_{_ele}$. O termo $E_{_vdW}$ representa a contribuição das interações de van der Waals, calculada com um potencial de Lennard-Jones modificado (com expoentes 6–9), e $E_{_ele}$ corresponde à energia eletrostática, obtida a partir da equação de Coulomb. Essa função estima a energia de interação ligante-receptor com base em grades pré-calculadas (Allen *et al.*, 2015). Essas grades armazenam valores de energia para interações de van der Waals e eletrostáticas, permitindo uma avaliação eficiente da *pose* encontrada sem a necessidade de cálculos diretos a cada iteração. Esse método agiliza o processo de *docking* ao reduzir o custo computacional para o cálculo das pontuações.

$$E_{\mathrm{vdW}} + E_{\mathrm{electrostatic}} =$$

$$\sum_{\mathrm{prot}} \sum_{\mathrm{lig}} \left[\left(\frac{A_{ij}}{d_{ij}^{a}} + \frac{B_{ij}}{d_{ij}^{b}} \right) + 332.0 \cdot \frac{q_i q_j}{\epsilon(d_{ij}) d_{ij}} \right]$$

Equação 1 – **Função de pontuação "Grid Score".** Esta é uma função baseada em campo de força utilizada pelo DOCK 6. A pontuação consiste em componentes de van der Waals e eletrostáticos.

1.5.2 Estratégias para validação de protocolo de *docking* molecular

A validação do protocolo de *docking* é uma etapa comumente realizada e que pode contribuir para o sucesso da aplicação da técnica. Durante a validação do protocolo, diferentes abordagens podem ser implementadas para avaliar aspectos variados relacionados à performance da técnica de *docking* molecular (Bender *et al.*, 2021).

Espera-se que o programa de *docking* seja capaz de reproduzir o modo de ligação correto entre uma proteína e um ligante. Para avaliar esse quesito, estratégias como *cross-docking* e *redocking* que são comumente implementadas. No *redocking* o ponto relevante a ser avaliado é a fidelidade da pose encontrada para os ligantes em relação as estruturas experimentais (Bender *et al.*, 2021). Já no *cross-docking,* ligantes que possuem o modo de ligação determinado experimentalmente são utilizados para simulações de *docking* com proteínas relacionadas aquela presente no complexo original (Bender *et al.*, 2021). Em ambos os casos, o sucesso do *docking* é avaliado por meio do cálculo do *Root Mean Square Deviation* (RMSD), que

quantifica a diferença entre a conformação prevista e o modo de ligação observado experimentalmente. O RMSD representa a média das distâncias quadráticas entre átomos equivalentes de duas estruturas sobrepostas, fornecendo uma medida da acurácia da predição (Laskowski; De Beer, 2004). Seu cálculo se baseia na diferença entre as coordenadas x, y e z de cada par de átomos correspondentes nas moléculas 1 e 2. Essas diferenças são elevadas ao quadrado, somadas e divididas pelo número total de átomos (n), sendo a raiz quadrada extraída ao final, resultando na seguinte equação:

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N}\sum_{i=1}^{N}[(x_i - x_i')^2 + (y_i - y_i')^2 + (z_i - z_i')^2]}$$

Equação 2 - Equação do desvio quadrático médio (RMSD). É utilizada para quantificar a diferença estrutural entre duas conformações moleculares, calculando a média da distância quadrática entre os átomos correspondentes nas duas estruturas.

A segunda forma de validação está relacionada ao enriquecimento da triagem virtual, que avalia a capacidade do protocolo de priorizar ligantes ativos em relação a moléculas inativas e/ou *decoys* (Bender *et al.*, 2021). De modo geral, os *decoy*s consistem em compostos com propriedades físico-químicas similares às das moléculas ativas, mas com estruturas químicas diferentes, presumindo-se, portanto, que sejam inativas. Dessa forma, o ranqueamento que pontua melhor os ativos com relação aos *decoys* indica que o programa de *docking* é capaz de identificar os ativos pelas suas interações com a proteína, e não somente por diferenças nas propriedades físicas.

Uma abordagem amplamente utilizada para essa avaliação é a análise das curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) que permitem visualizar a relação entre sensibilidade e especificidade do modelo (Brozell *et al.*, 2012). A sensibilidade, por sua vez, refere-se à capacidade do modelo de identificar corretamente os ligantes ativos, enquanto a especificidade está relacionada à habilidade de classificar corretamente os compostos inativos. Idealmente, um protocolo de *docking* eficaz deve apresentar alta sensibilidade, garantindo que as moléculas ativas sejam corretamente identificadas, e alta especificidade, minimizando a ocorrência de falsos positivos (ou seja, compostos inativos erroneamente classificados como ativos).

Para quantificar o desempenho global do protocolo, utiliza-se a métrica área sob a curva (AUC), derivada da curva ROC. A AUC representa a probabilidade de o modelo classificar corretamente um composto que interage com o alvo, em comparação com um composto que

não interage (Brozell *et al.*, 2012). Um valor de AUC igual a 0,5 indica que o modelo possui desempenho equivalente ao de uma classificação aleatória, sem capacidade discriminatória. Por outro lado, AUC = 1 corresponde a um modelo perfeito, que consegue distinguir perfeitamente compostos ativos e *decoys*.

No contexto de triagens virtuais que avaliam centenas de milhões de moléculas, apenas uma pequena fração das poses melhor ranqueadas costuma ser analisada mais cuidadosamente, geralmente os 0,1% superiores. Dessa forma, além de distinguir corretamente entre compostos ativos e decoys, um modelo eficaz deve priorizar a classificação de ativos no topo do ranking. Para essa avaliação, métricas como logAUC, *Boltzmann-Enhanced Discrimination of ROC* (BEDROC) e fator de enriquecimento (EF, *Enrichment Factor*) podem ser utilizadas.

O logAUC é uma variação da métrica AUC que aplica uma transformação logarítmica à taxa de falsos positivos, enfatizando a priorização precoce de compostos ativos (Bender *et al.*, 2021). Valores mais altos de logAUC indicam uma melhor distinção entre compostos ativos e inativos dentro de uma faixa inicial da base triada. De forma semelhante, a métrica BEDROC também busca capturar essa capacidade de priorização inicial, mas atribuindo maior peso aos compostos ativos identificados nas primeiras posições da lista ranqueada (Truchon; Bayly, 2007). Dessa forma, BEDROC permite uma avaliação mais refinada da capacidade do modelo de priorizar ligantes ativos nas primeiras posições do ranking, sendo particularmente útil em cenários onde apenas os compostos melhor classificados são avaliados experimentalmente.

Outra métrica comumente empregada é o fator de enriquecimento (EF), que mede a proporção de ligantes ativos recuperados dentro de uma determinada fração da base triada, comparando com a recuperação esperada se os compostos fossem classificados aleatoriamente (Truchon; Bayly, 2007). O cálculo do fator de enriquecimento para uma porcentagem *x* da base triada é dado por:

$$EF(x) = \frac{\frac{A_x}{N_x}}{\frac{A_{\text{total}}}{N_{\text{total}}}}$$

Equação 3 - Equação do fator de enriquecimento (EF). Quantifica a capacidade de um modelo de *docking* em identificar compostos ativos, comparando a proporção de compostos ativos encontrados na porcentagem da base triada com a proporção de compostos ativos no banco de dados.

Onde A_x representa o número de ligantes ativos recuperados dentro da faixa *x*% da base, A_{total} é o número total de compostos ativos na base de dados, N_x corresponde ao número total de compostos presentes na porcentagem *x*% da base, e N_{total} representa o número total de ligantes

avaliados. Um protocolo eficiente deve apresentar valores elevados de fator de enriquecimento para baixas porcentagens da base triada, indicando que o método é capaz de priorizar corretamente os ligantes ativos, diferenciando-os dos compostos inativos e/ou *decoys*. No entanto, essa métrica atribui o mesmo peso a todos os compostos ativos dentro da faixa *x*% da base triada. Ou seja, se dez compostos ativos estiverem entre os primeiros 1% da lista ranqueada, o EF não diferencia um modelo que os coloca nas primeiras posições de outro que os posiciona no final dessa fração. Portanto, o uso de diferentes métricas contribui para uma avaliação mais completa e robusta do protocolo de *docking*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o impacto de substituições em subtipos de cruzipaínas nas interações com inibidores descritos para cruzaína, com o intuito de compreender como essas modificações podem afetar o perfil de interação e a eficácia dos inibidores.

2.2 Objetivos Específicos

i) Desenvolver e validar um protocolo de *docking* molecular para a cruzipaína1 utilizando o programa DOCK 6;

ii) Avaliar os efeitos das substituições nas interações entre as cruzipaínas e os inibidores por meio de técnicas de *docking* molecular, *rescoring* e simulações de dinâmica molecular, para identificar como essas modificações influenciam a afinidade e a estabilidade dos complexos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Definição dos conjuntos de compostos avaliados neste estudo

Três conjuntos principais de compostos foram definidos e utilizados em etapas envolvendo simulações de *docking* molecular, sendo eles: conjunto de moléculas ativas; *decoys* e ligantes cristalográficos da cruzaína. Para construir o grupo de ativos, buscamos nas bases de dados PubChem (Kim *et al.*, 2025) e BindingDB (Gilson *et al.*, 2016), bem como em artigos indexados no PubMed (PubMed, 2025), por compostos previamente avaliados experimentalmente contra a cruzaína. Ao todo obtivemos uma base de 2681 compostos. Dentre eles, 111 inibidores não covalentes, com valores de IC_{50} ou $Ki \leq 100$ μM e pertencentes a diferentes classes químicas, foram considerados como ativos (**Tabela A1**, Anexo 1).

Este conjunto de ativos foi utilizado para a construção do conjunto de *decoys* através do programa DUDE-Z (Stein *et al.*, 2021). Este programa extrai propriedades físico-químicas das moléculas ativas, como: peso molecular, coeficiente de partição água-octanol (cLogP), número de ligações rotacionáveis, número de aceptores e de doadores de ligação de hidrogênio e carga total. A partir destas informações é realizada uma busca no banco de dados ZINC15 (Sterling; Irwin, 2015) por moléculas com características físico-químicas semelhantes e com estruturas dissimilares em relação às ativas (coeficiente de Tanimoto ≤ 0.35).

Durante o processo de geração dos *decoys*, o DUDE-Z realiza uma clusterização das moléculas ativas com base no coeficiente de Tanimoto, agrupando aqueles com similaridade maior ou igual a 0,7 (Stein *et al.*, 2021). Para cada cluster, a molécula com menor massa molecular é selecionada como representante, a partir da qual os *decoys* são gerados. Esse procedimento resulta na formação de um conjunto reduzido de moléculas ativas, o que, por sua vez, contribui para uma diminuição no tempo necessário para a construção dos *decoys*. Ao todo foram geradas 3404 *decoys* a partir de 55 moléculas ativas selecionados pelo DUDE-Z do conjunto inicial de 111 ligantes.

Ambos os conjuntos de ativos e *decoys* foram utilizados na etapa de validação do protocolo de *docking*, especificamente nas análises de enriquecimento.

O terceiro conjunto de compostos consiste em inibidores da cruzaína presentes em complexos cristalográficos disponíveis no PDB. Selecionamos um conjunto de 23 inibidores, dentre os quais estão inclusos compostos peptídicos, não peptídicos, covalentes ou não covalentes (**Tabela A2**, Anexo 1). Estes compostos foram utilizados durante a validação do protocolo de *docking*, na etapa de *redocking*.

3.2 Análise e caracterização dos conjuntos de compostos

Os *fingerprints* de Morgan são representações binárias da estrutura químicas das moléculas e foram calculados para cada composto do conjunto de moléculas ativas utilizando o RDKit (Greg Landrum *et al.*, 2025). A partir desses *fingerprints*, os coeficientes de similaridade de Tanimoto (Tc) foram determinados pelo mesmo programa e organizados em uma matriz de similaridade, representando os valores para cada par de compostos. Para avaliar a diversidade química do conjunto, um script *in-house* em Python foi utilizado para calcular a porcentagem de valores de Tc abaixo de 0,3. A matriz de similaridade foi então utilizada para a construção de um mapa de calor, gerado por meio de um script *in-house* em Python. As estruturas químicas dos compostos foram desenhadas com o programa MarvinSketch.

As propriedades físico-químicas — incluindo peso molecular, cLogP, número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio e número de ligações rotacionáveis — foram calculadas no programa DataWarrior (Sander *et al.*, 2015). A distribuição desses valores para os conjuntos de ativos e *decoys* foi analisada por meio de um script *in-house* em R.

3.3 Preparação das moléculas para *docking* molecular

Para o conjunto de moléculas ativas, as representações das estruturas químicas na forma de SMILES foram obtidas a partir das bases de dados analisadas. No caso das *decoys*, os SMILES foram automaticamente gerados pelo DUDE-Z. Já para os inibidores presentes em complexos cristalográficos, as estruturas químicas foram desenhadas utilizando o programa Marvin Sketch, com base nas informações disponíveis nos artigos correspondentes.

Os SMILES de cada molécula foram armazenados em arquivos individuais com extensão *.smi*. A seguir, foi realizada a preparação estrutural dos compostos, incluindo a determinação do estado de ionização, a geração de conformações e o cálculo das cargas parciais, utilizando ferramentas da OpenEye Scientific Software (QUACPAC 2.2.5.0, OpenEye, Cadence Molecular Sciences, Santa Fe, NM, http://www.eyesopen.com).

Inicialmente, os arquivos *.smi* foram utilizados como entrada no programa FixPka, que determinou o estado de ionização de cada composto considerando pH 7.4. Em seguida, as estruturas protonadas, ainda no formato *.smi*, foram processadas no programa OMEGA, responsável por gerar uma conformação de menor energia para cada molécula e armazená-las em arquivos no formato *.mol2*. Por fim, esses arquivos foram utilizados como entrada para o programa molcharge, que realizou o cálculo das cargas parciais conforme o campo de força AM1-BCC (Jakalian; Jack; Bayly, 2002).

3.4 Preparação das estruturas tridimensionais das cruzipaínas

Os complexos cristalográficos foram obtidos a partir do banco de proteínas PDB. Ligantes e moléculas de água foram removidas, mantendo-se apenas a estrutura da proteína. Para determinar os estados de ionização dos resíduos utilizamos o servidor PROPKA (Jurrus *et al.*, 2018). Neste, a estrutura da proteína em formato .pdb foi utilizada como entrada e o pH foi definido como 7.4 e o campo de força selecionado para a atribuição de parâmetros para a proteína foi o ff99SB (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010). O estado de ionização dos resíduos Cys25, Glu208 e His 162 foram definidos manualmente. A díade catalítica (Cys25 e His162) foi definida como um par iônico e o Glu208 foi mantido com carga negativa. As cargas parciais foram adicionadas utilizando o modelo de carga AM1-BCC (Jakalian; Jack; Bayly, 2002) através da ferramenta "Add Charge", disponível no CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004).

3.5 Protocolo de *docking* molecular

As simulações de *docking* molecular foram realizadas com o programa DOCK 6.11 (Allen *et al.*, 2015). Utilizamos o método de construção incremental (*anchor-and-grow*), no qual os ligantes são tratados como flexíveis, enquanto a proteína é considerada rígida, e a função de pontuação *Grid Score* (Equação 1). As âncoras foram definidas como segmentos rígidos dos ligantes contendo no mínimo 5 átomos. O número máximo de orientações geradas para cada âncora foi igual a 100. Para cada molécula, foram geradas até 500 orientações e as 10 poses mais bem pontuadas foram salvas para posterior inspeção visual.

A caixa, utilizada para o cálculo do *grid* pelo programa DOCK 6.11 (Allen *et al.*, 2015), foi definida com base nas esferas geradas a partir do ligante **2V5** do complexo cristalográfico PDB 4PI3 (Jones *et al.*, 2016). Este ligante ocupa os principais subsítios do sito ativo da cruzaína que frequentemente interagem com inibidores (S3, S2, S1, S1`). Após inspeção da caixa gerada, fizemos pequenos ajustes nas dimensões para garantir a inclusão de todos os resíduos que compõem os subsítios S3, S2, S1, S1', resultando na caixa final com dimensões X = 26,2 Å, Y= 26,0 Å, Z = 23,12 Å e coordenadas do centro X = 7,72, Y= -10,34 e Z = 5,81.

3.6 Análise de enriquecimento

A análise de enriquecimento foi realizada para avaliar a capacidade do protocolo de *docking* de atribuir melhores pontuações aos ligantes ativos em comparação aos *decoys*. Os conjuntos de ativos e *decoys* foram construídos conforme descrito no tópico 3.1, e o *docking* molecular foi realizado de acordo com o protocolo definido no tópico 3.4.

Para a avaliação do desempenho do *docking*, utilizamos o pacote ROCR, disponível na linguagem R. Com esse pacote, geramos curvas ROC, calculamos a área sob a curva (AUC), logAUC e determinamos os fatores de enriquecimento nos percentis de 0,1%, 1%, 5% e 10% da base de compostos.

3.7 *Redocking*

Para o *redocking* selecionamos 23 complexos cruzaína-inibidor disponíveis no PDB. As estruturas químicas destes compostos foram desenhadas e preparadas conforme descrito no tópico 3.1. A análise da reprodução do modo de ligação cristalográfico foi feita a partir dos valores de RMSD.

O cálculo de RMSD foi feito a partir de script fornecido pela Schrödinger (SCHRÖDINGER, 2024). Para isso, inicialmente, o complexo cristalográfico cruzaína-inibidor e a estrutura da proteína utilizada no *docking* foram alinhados utilizando o programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015). Posteriormente, o ligante cristalográfico foi extraído e salvo em um arquivo no formato .mae. O mesmo foi feito para as 10 poses melhor ranqueadas pelo protocolo de *docking*. Por fim, especificamos a opção "use_neutral_scaffold" para que o programa desconsidere efeitos de ionização, concentrando-se apenas na geometria dos átomos pesados conectados por ligações simples, facilitando a comparação das estruturas.

3.8 Modelagem comparativa dos subtipos de cruzipaínas

Para a modelagem comparativa, selecionamos as sequências de cada subtipo com base em um trabalho prévio do nosso grupo sobre o repertório gênico das cruzipaínas (Santos *et al.*, 2021). As sequências de nucleotídeos foram obtidas do GenBank, os códigos de acesso para os subtipos czp.2.II.6_esmo, czp.3.II.7_esmo, czp.3.II.9_non-esmo e czp.4.II.7_non-esmo são, respectivamente, MZ087228.1, MZ087227.1, MZ087237.1, MZ087239.1.

Com o objetivo de predizer o modelo apenas para o domínio catalítico, as regiões correspondentes ao peptídeo sinal, pró-domínio e extensão C-terminal foram removidas. A modelagem comparativa foi realizada utilizando o programa Modeller v10.4 (Šali; Blundell, 1993), no qual o ligante foi transferido do molde para o modelo gerado. Os 100 modelos gerados pelo Modeller foram avaliados através da pontuação DOPE (Discrete Optimized Protein Energy). Os modelos de melhor pontuação foram selecionados para posterior minimização de energia pelo servidor online YASARA (Krieger *et al.*, 2009). Este programa realiza, inicialmente, uma minimização de energia aplicando o algoritmo *steepest-descent*, solvente implícito e o campo de força YASARA2 (Krieger *et al.*, 2009). Em seguida, as redes de ligações

de hidrogênio são otimizadas, o solvente explícito é adicionado e os estados de protonação são determinados para pH 7,4. Posteriormente, uma nova minimização de energia é realizada utilizando o algoritmo *steepest-descent* para remover possíveis impedimentos estéricos remanescentes, seguido por uma minimização com o algorítmo *simulated annealing* com velocidades dos átomos reduzidas em 0,9 a cada dez passos. A minimização de energia é finalizada quando a variação da energia entre as conformações amostradas se torna inferior a 0.05 kJ/mol por átomo ao longo de 200 passos.

Após a minimização de energia, realizamos a validação da qualidade estereoquímica dos modelos através dos servidores Molprobity (Chen, Vincent B. *et al.*, 2010), ERRAT (Colovos; Yeates, 1993), e QMEAN (Benkert; Biasini; Schwede, 2011). Esses programas avaliam parâmetros estereoquímicos, como os comprimentos de ligação, as conformações das cadeias laterais, a planaridade das ligações peptídicas, os ângulos torcionais da cadeia principal e das cadeias laterais, além de detectar impedimentos estéricos entre átomos não ligados. Adicionalmente, é gerado um gráfico de Ramachandran, o qual também contribui para a avaliação da qualidade estrutural do modelo.

Os modelos utilizados para o *docking* molecular foram construídos a partir do molde PDB: 4PI3, que corresponde a um complexo cruzaína-vinilsulfona, no qual o ligante ocupa os principais subsítios da proteína (S3, S2, S1 e S1`). Para as análises de dinâmica molecular, construímos modelos a partir do molde PDB: 1AIM (Gillmor; Craik; Fletterick, 1997), que consiste em um complexo fluormetilcetona-vinilsulfona. Em ambos os casos, foi realizada a transferência do ligante para o modelo pelo Modeller, conforme descrito anteriormente.

Os mapas de potencial lipofílico molecular foram calculados para os modelos das cruzipaínas gerados com base no molde PDB 4PI3, utilizando o software ChimeraX (Meng *et al.*, 2023). O cálculo foi realizado por meio do comando mlp (Molecular Lipophilicity Potential), que permite mapear e visualizar a distribuição da lipofilicidade na superfície da proteína.

Os mapas gerados representam a variação do potencial lipofílico com base nas características químicas dos átomos, onde regiões hidrofóbicas são indicadas por cores quentes (amarelo) e regiões hidrofílicas por cores frias (azul). Essa análise é relevante para avaliar a distribuição da hidrofobicidade nas cruzipaínas, fornecendo informações sobre o impacto das substituições nesta propriedade.

3.9 *Docking* de inibidores contra os subtipos de cruzipaínas

Para as simulações de *docking* molecular contra os modelos das cruzipaínas, selecionamos inbidores para os quais o modo de ligação cristalográfico foi reproduzido com sucesso durante a etapa de *redocking*. As 10 poses mais bem pontuadas foram salvas e a pose com melhor pontuação foi inspecionada para análise de complementariedade estérica com o sítio ativo das cruzipaínas, bem como potenciais interações com resíduos de aminoácidos. Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas cruzaína-composto foram identificadas pelo programa Discovery Studio (Dassault Systèmes, 2020). Todas as figuras que apresentam resultados de *docking* foram geradas pelo programa PyMOL (Schrödinger, LLC, 2015)

3.10 *Rescoring* de poses de *docking* utilizando MM-PBSA

O *rescoring* das poses melhor pontuadas obtidas pelo protocolo de *docking* foi realizado no servidor web *Fast Amber Rescoring* (Wang, Zhe *et al.*, 2019). Este programa foi desenvolvido para realizar o *rescoring* de resultados de *docking* através de métodos baseados em MM-PBSA. Como entrada, foram fornecidos a estrutura da proteína utilizada no *docking* em formato .pdb e a pose melhor pontuada em formato .mol2. Os valores de energia calculados foram obtidos em arquivo de saída no formato .csv e os gráficos gerados a partir da análise destes dados foram construídos com scripts *in-house* em python e R.

3.11 Simulações de dinâmica molecular de inibidor da cruzaína com modelos das cruzipaínas

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas a partir dos modelos gerados utilizando a estrutura cristalográfica PDB 1AIM como molde. O inibidor presente neste complexo, uma flurometilcetona, foi transferido para o modelo conforme descrito na seção 3.7. A preparação dos sistemas cruzipaína-ligante foi conduzida no servidor CHARMM-GUI (Jo *et al.*, 2008), visando a posterior execução das simulações no GROMACS (Abraham *et al.*, 2015).

Para a proteína, o pH do sistema foi ajustado para 7,4, determinando os estados de ionização dos resíduos Cys25, Glu208 e His162. A díade catalítica (Cys25 e His162) foi definida como um par iônico, e o Glu208 foi mantido em seu estado ionizado, com carga negativa. Todas as posições envolvidas em pontes dissulfeto foram especificadas.

A topologia do ligante foi obtida através do *General Force Field* (CGenFF) (Vanommeslaeghe *et al.*, 2010). As cargas parciais para o ligante foram calculadas pelo programa Open Babel (O'Boyle *et al.*, 2011) utilizando o modelo de Gasteiger considerando pH 7,4.

A solvatação foi realizada com o modelo de água TIP3P e em uma caixa retangular com 12,0 Å de distância entre sua borda e a molécula mais externa. A carga do sistema foi neutralizada a partir da adição de íons feita pelo método Monte Carlo, ajustando a concentração de NaCl para 0,15 mM. Na seção "Periodic Boundary Condition Options", a opção "Generate grid information for PME FFT automatically", garantiu a criação do grid necessário para o cálculo da eletrostática com o algoritmo *Particle Mesh Ewald* (PME).

Na definição do campo de força, utilizamos o CHARMM36m (Huang, Jing *et al.*, 2017). Os inputs foram gerados para simulação no GROMACS, com temperatura ajustada para 310 K e configuração dos *ensembles* NVT (volume constante) e NPT (pressão constante).

Para o primeiro passo de minimização de energia, utilizamos o algoritmo *steepest descent* e submetemos o sistema a 5000 ciclos com uma tolerância de 1000 kJ mol-1 nm-1. Esta minimização foi realizada a volume constante utilizando o método PME (*particle mesh Ewald*) para tratar as interações eletrostáticas.

A minimização de energia foi seguida por simulações de equilibração com os ensembles NVT e NPT. A temperatura foi mantida a 310 K, acoplada ao sistema por um termostato V-rescale (1 ps), enquanto a pressão também foi mantida constante a 1 bar utilizando o algoritmo de acoplamento Parinello-Rahman. Três réplicas de simulações de dinâmica molecular não restrita, nas quais não foram impostas restrições de movimento às moléculas, foram realizadas por 100 ns para cada sistema.

A clusterização das trajetórias de dinâmica molecular foi realizada utilizando o programa CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004), tendo como base o RMSD calculado entre os frames da simulação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Validação do protocolo de *docking* molecular

Para avaliar o protocolo de *docking* molecular adotamos duas estratégias: a análise de enriquecimento e o *redocking*. Para a primeira delas, construímos um conjunto de moléculas ativas e um grupo de *decoys*. Já para o *redocking* selecionamos inibidores de complexos cristalográficos. A seguir será discutido a construção dos conjuntos de moléculas, bem como os as análises implementadas para validar o protocolo.

4.1.1 Construção e caracterização dos conjuntos de compostos avaliados

4.1.1.1 Ativos e *decoys*

Para a construção do conjunto de moléculas ativas, consideramos 111 inibidores da cruzaína relacionados de 15 artigos científicos (Anexo 1, **Tabela A1**). Esses compostos pertencem a diversas classes químicas, incluindo quinolinas, quinazolinas, tiazóis, uréias, cetonas e benzimidazóis (**Figura 11A**). As potências reportadas (IC_{50} e K_i) variam de 0,004 μM até 77,5 μM, sendo que a maioria das moléculas (56 de 111) apresenta valores inferiores a 10 μM.

Com o objetivo de avaliar a diversidade química desse conjunto, calculamos os *fingerprints* de Morgan utilizando o RDKit e, a partir deles, os coeficientes de similaridade de Tanimoto. A comparação entre pares de moléculas resultou em uma matriz de similaridade, que revelou um predomínio de valores baixos de Tc (Tc < 0,3 para 90,7% das comparações em pares), evidenciando a alta diversidade estrutural do conjunto. Para visualizar essa diversidade, construímos um mapa de calor a partir da matriz de similaridade (**Figura 11B**), no qual é possível observar a predominância de valores baixos de Tc, em azul, conforme descrito anteriormente. Apesar da diversidade geral do conjunto, algumas classes químicas, como os benzimidazóis, estão mais representadas conforme indicado pelos maiores valores de Tc e agrupamentos verde-amarelo (**Figura 11B**).

A partir desse conjunto de moléculas ativas, geramos *decoys* utilizando o programa DUDE-Z. Conforme descrito na Seção 3.1, esse programa filtrou os 111 compostos ativos, selecionando 55 moléculas para a geração dos *decoys*. Na **Figura 11C**, observa-se o mapa de calor correspondente a 74 SMILES dos ativos filtrados, considerando os estados de ionização definidos para pH 7,4. Observamos que essa filtragem reduz o número de compostos, mantendo, entretanto, a diversidade química do conjunto (Tc < 0,3 para 94,3% das comparações em pares).

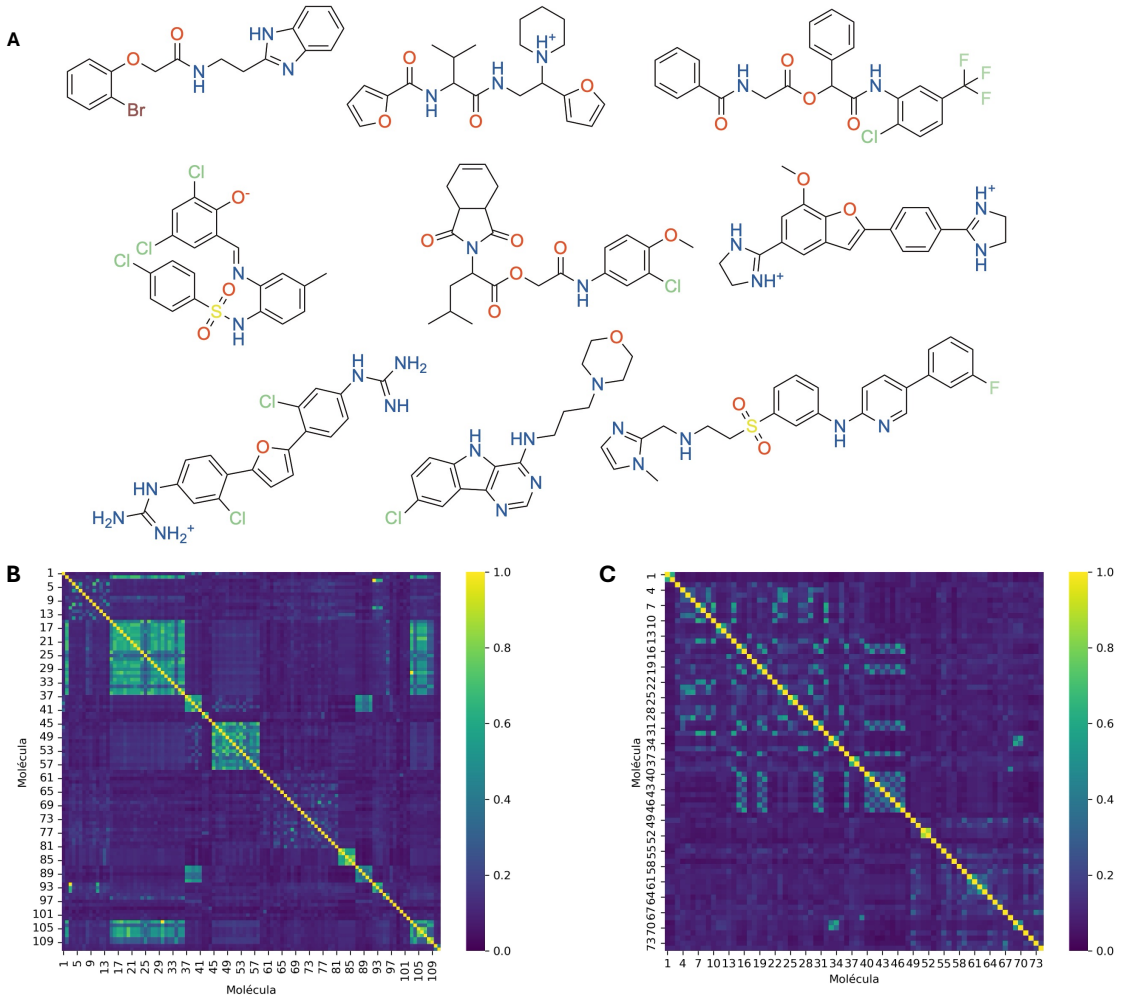


Figura 11 – Moléculas representativas do conjunto de ativos e mapas de calor com coeficientes de Tanimoto. A) Estrutura química de moléculas pertencentes a classes químicas distintas e que fazem parte do conjunto de ativos. B) Mapa de calor para o conjunto inicial de ativos formado por 111 inibidores da cruzaína. C) Mapa de calor para os 74 SMILES ativos utilizados pelo DUDE-Z, os quais representam 55 inibidores do conjunto inicial de 111 compostos.

Para compreender melhor a diversidade química do conjunto de ativos filtrados (55 moléculas) e dos *decoys* geradas a partir deles (3.404 moléculas), avaliamos diversas propriedades físico-químicas. Utilizando o programa DataWarrior, calculamos o peso molecular, cLogP, número de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, e número de ligações rotacionáveis. As faixas de valores obtidas estão representadas na **Tabela 2**, com o valor mínimo e máximo representados para cada propriedade.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas calculadas para os conjuntos de ativos e decoys

Parâmetro	Ativos Filtrados	Decoys
Peso Molecular (g/mol)	193,6 - 474,5	110,1 - 351,4
cLogP	-2,71 - 6,22	-7,3 - 6,6
Aceptores de Ligações de Hidrogênio	1 - 9	0 - 10
Doadores de Ligações de Hidrogênio	0 - 6	0 - 6
Número de Ligações Rotacionáveis	1 - 11	0 - 11

A **Figura 12** exibe a distribuição dessas propriedades para os conjuntos de ativos e *decoys*. Como esperado, os *decoys* apresentam propriedades físico-químicas semelhantes às dos compostos ativos, o que pode ser evidenciado pela sobreposição parcial das distribuições. No entanto, observa-se que, de modo geral, os *decoys* possuem um peso molecular menor. Esse efeito está relacionado ao viés da base de dados ZINC15, que contém uma grande proporção de moléculas com peso molecular entre 300 e 350 Da (Stein *et al.*, 2021).

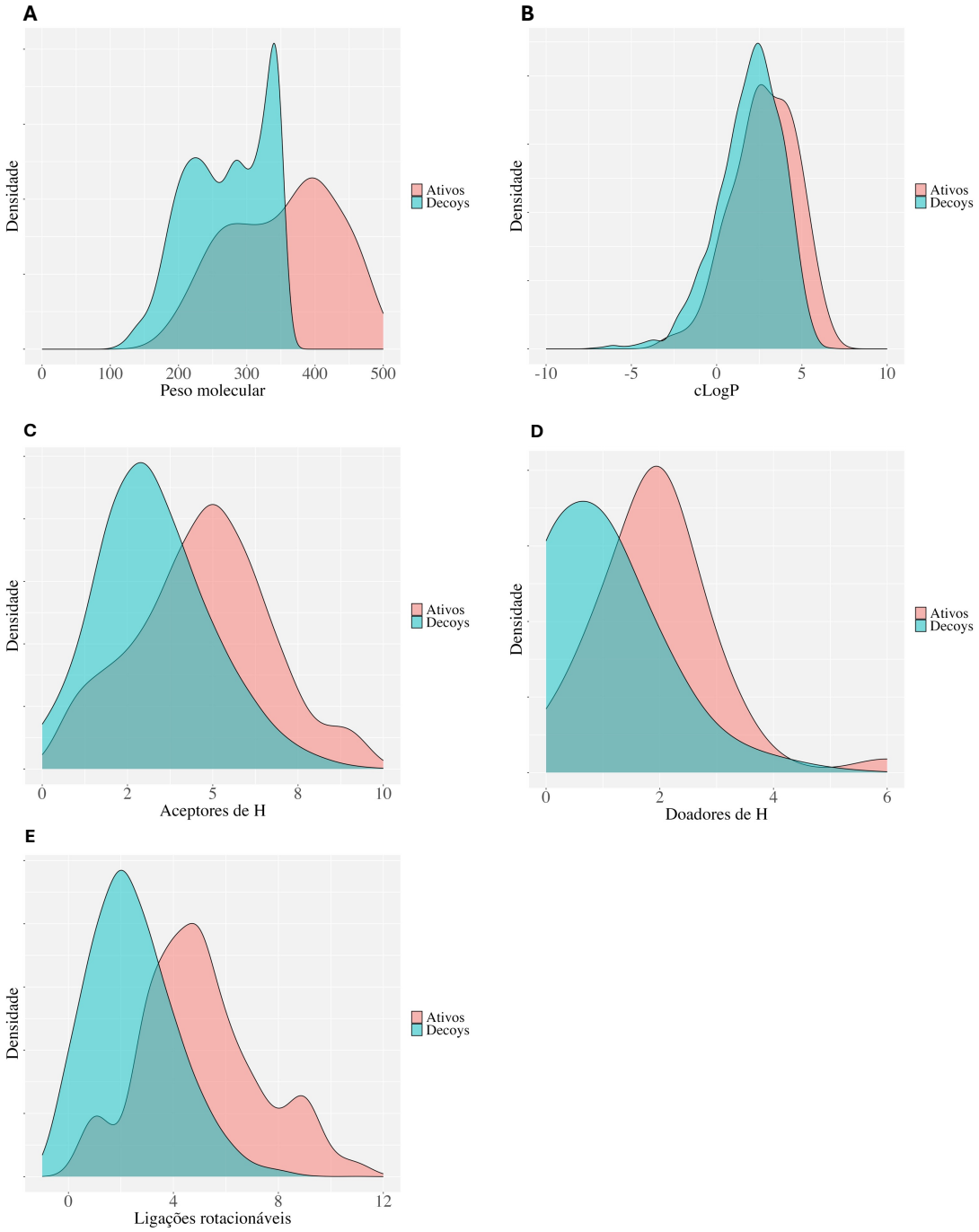


Figura 12 – Distribuição de valores obtidos para propriedades físico-químicas dos conjuntos de ativos filtrados pelo DUDE-Z e *decoys*. Distribuição dos valores para A) peso molecular, B) cLogP, C) aceptores de ligação de hidrogênio, D) doadores de ligação de hidrogênio e E) número de ligações rotacionáveis.

De maneira geral, os valores das propriedades calculadas indicam que os conjuntos são quimicamente diversos, abrangendo uma ampla faixa de variação. Além disso, a similaridade entre os conjuntos de ativos e *decoys* fica evidente na análise das distribuições das propriedades, reforçando a adequação dos *decoys* como controles na validação do protocolo de *docking*.

4.1.1.2 Inibidores cristalográficos da cruzaína

O terceiro conjunto de compostos analisado possui 23 inibidores da cruzaína (Anexo 1, **Tabela A2**), todos provenientes de complexos cristalográficos disponíveis no PDB e selecionados para a análise de *redocking*. De modo geral, essas estruturas apresentam alta qualidade estrutural, com 16 complexos cristalográficos possuindo resolução inferior a 2Å, o que confere maior confiabilidade às análises.

Os inibidores incluem tanto compostos peptídicos quanto não peptídicos, além de atuarem por mecanismos de inibição covalente e não covalente. No total, foram identificadas nove classes químicas distintas (**Figura 13**). As vinilsulfonas representam a classe mais abundante, com 10 inibidores, seguidas pelas fluormetilcetonas, com 4 compostos. Outras classes incluem nitrilas (2 inibidores), hidroximetilcetonas (2 inibidores), e cinco classes representadas por um único composto cada: benzimidazol, triazol, epóxido, alfa-cetoéster e galinamida. Entre os 23 complexos analisados, apenas 5 contêm inibidores não covalentes, enquanto os demais são inibidores covalentes, sendo alguns deles irreversíveis e outros reversíveis.

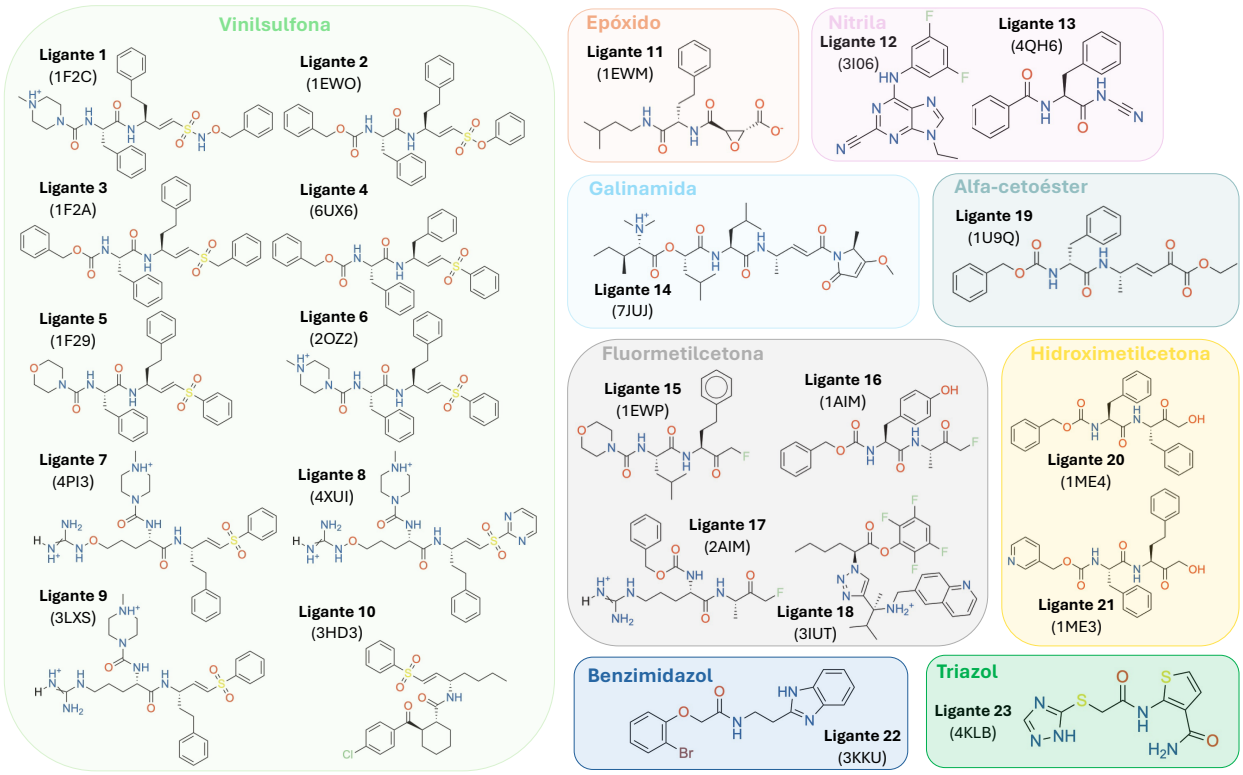


Figura 13 – Conjunto de 23 ligantes cristalográficos da cruzaína selecionados para este estudo. As estruturas químicas dos compostos estão agrupadas com base nas respectivas classes químicas. Para cada ligante, o código PDB do complexo cristalográfico com a cruzaína está representado entre parênteses.

4.1.2 Análise de enriquecimento

Para avaliar a performance do protocolo de *docking* na atribuição de melhores pontuações aos ligantes ativos em comparação aos *decoys*, realizamos o *docking* desses dois conjuntos de moléculas contra a cruzaína. A análise dos resultados por meio da curva ROC (**Figura 14A**) e do valor da AUC indica que o modelo possui uma boa capacidade de discriminação entre moléculas ativas e *decoys*, com um desempenho superior ao de uma classificação aleatória (AUC = 0,5).

Além da AUC, outras métricas são amplamente utilizadas para avaliar a eficácia de um protocolo de *docking*, especialmente em aplicações futuras de triagem virtual. Nessas triagens, os pesquisadores geralmente selecionam os compostos mais bem ranqueados, correspondentes a uma fração de 0,1-10% da base total. Assim, um protocolo ideal não apenas diferencia ativos de *decoys*, mas também os posiciona no topo da classificação.

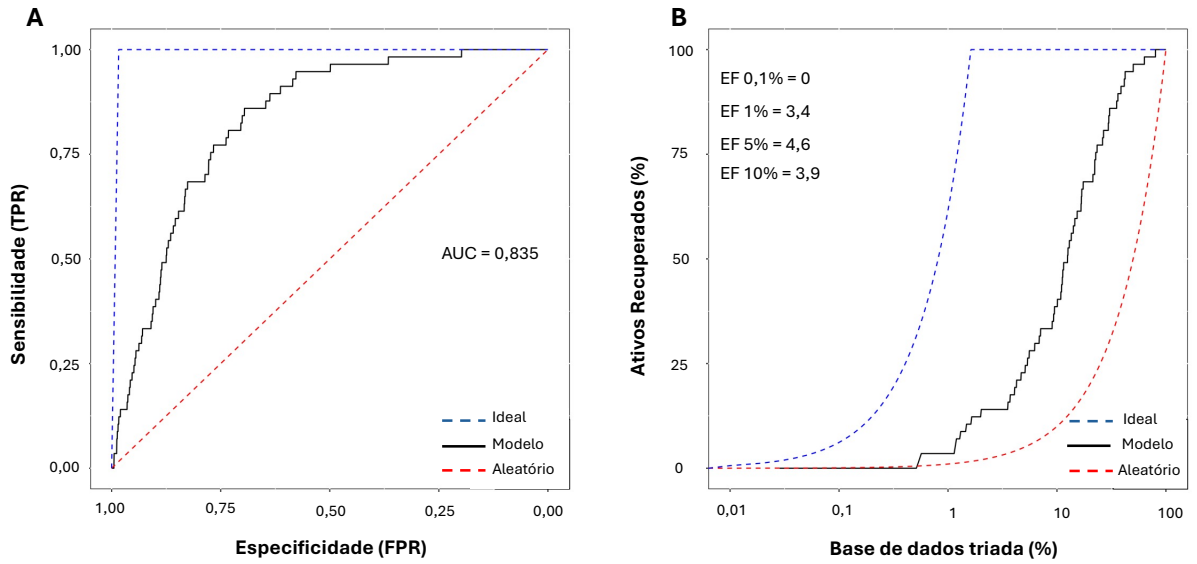


Figura 14 – Performance do protocolo de *docking* nas análises de enriquecimento. A) Curva ROC. B) Porcentagem de ativos recuperados para faixas da base de dado triada. TPR (True Positive Rate) representa a taxa de verdadeiros positivos e FPR (False Positive Rate) a taxa de falsos positivos.

O logAUC é uma variação da métrica AUC que aplica uma transformação logarítmica à taxa de falsos positivos, enfatizando a priorização precoce de compostos ativos. Para o protocolo avaliado, obtivemos um valor de 19,2 para o logAUC ajustado considerando os 10% iniciais da base triada. Esse resultado indica que o protocolo apresenta desempenho superior ao aleatório na priorização de compostos ativos entre as primeiras posições, embora ainda distante do ideal (**Figura 14B**).

Outra métrica útil na avaliação da recuperação precoce de compostos ativos é o fator de enriquecimento (EF), que quantifica a recuperação de ligantes ativos em diferentes percentuais da base triada. Podemos observar que para os primeiros 0,1% da base triada, nenhum composto ativo foi recuperado (EF0,1% = 0), enquanto para 1% da base, apenas dois ativos foram identificados (EF1% = 3,4). Esses resultados sugerem que o protocolo testado pode não ser o mais adequado para uma triagem virtual, pois apresenta uma baixa recuperação de ligantes ativos nos percentuais iniciais da base triada (**Figura 14B**). A partir dos percentuais de 5% e 10%, o número de ativos recuperados aumenta para 13 (EF5% = 4,6) e 22 (EF10% = 3,9), respectivamente. No entanto, esse desempenho ainda pode ser considerado insatisfatório para aplicações em triagens virtuais.

Apesar dessas limitações, é importante ressaltar que o objetivo deste estudo não foi a realização de triagens virtuais, portanto, mantivemos o protocolo e avaliamos o seu desempenho no *redocking*. Entretanto, fica evidente a necessidade de otimização para uma futura aplicação em triagens virtuais.

4.1.3 *Redocking*

A fim de verificar se a pose gerada pelo *docking* reproduziu com precisão o modo de ligação cristalográfico, utilizamos a métrica de RMSD. Na literatura, valores de RMSD ≤ 2 Å são amplamente aceitos como critério de sucesso na reprodução da pose cristalográfica (Castro-Alvarez; Costa; Vilarrasa, 2017). Neste estudo, adotamos também um segundo critério: para os ligantes com RMSD entre 2 e 3 Å, realizamos uma inspeção visual das poses geradas para avaliar se mantinham a maioria das interações observadas na estrutura cristalográfica. No caso de ligantes covalentes, analisamos adicionalmente se o grupo eletrofílico estava posicionado de forma semelhante ao cristal, localizado próximo a Cys25. Aqueles que atenderam a esses critérios também foram considerados sucessos no *redocking*. Os valores de RMSD para a pose melhor ranqueada de cada ligante estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Valores de RMSD para ligantes submetidos ao *redocking* contra a cruzaína

Código PDB	Tipo de Ligante	Valor RMSD (Å)
1AIM	Fluormetilcetona	0,62*
2AIM	Fluormetilcetona	8,82
1EWP	Fluormetilcetona	1,53*
1EWO	Vinil sulfona	1,29*
1F2A	Vinil sulfona	2,34*
1F2C	Vinil sulfona	1,01*
1F29	Vinil sulfona	0,93*
3LXS	Vinil sulfona	8,04
4PI3	Vinil sulfona	6,91
4XUI	Vinil sulfona	7,34
2OZ2	Vinil sulfona	1,14*
3HD3	Vinil sulfona	5,79
6UX6	Vinil sulfona	2,32*
3I06	Nitrila	3,02
4QH6	Nitrila	5,68
1ME3	Hidroximetilcetona	1,21*
1ME4	Hidroximetilcetona	0,84*
3KKU	Amida, Benzimidazol	7,26
4KLB	Amida, Tiofeno, Triazol	6,96

1EWM	Epóxido	1,1*
1U9Q	Alfa-cetoester	3,84
7JUJ	Gallinamida	2,41*
3IUT	Fluorfenoximetilcetona	5,6

*Sucesso do *redocking*, com a reprodução do modo de ligação cristalográfico

No total, o protocolo de *docking* foi capaz de reproduzir o modo de ligação cristalográfico de 12 dos 23 ligantes, representando uma taxa de sucesso de 52%. Dentre esses, nove inibidores apresentaram valores de RMSD entre 0,62 e 1,53 Å, enquanto os ligantes **3**, **4** e **14** apresentaram RMSDs entre 2,32 e 2,41 Å. Embora esses valores sejam ligeramente superiores ao limite convencional de 2 Å, observamos que as interações foram preservadas e o grupo eletrofílico foi posicionado de maneira semelhante ao observado na estrutura cristalográfica, o que justifica a classificação como sucesso no *redocking.*

Para exemplificar a classificação dos resultados de *redocking*, a **Figura 15** apresenta três casos distintos: os ligantes **16** e **4**, que compõem o grupo de compostos com sucesso no *redocking*, e o ligante **3**, que representa um caso de falha na reprodução do modo de ligação experimental.

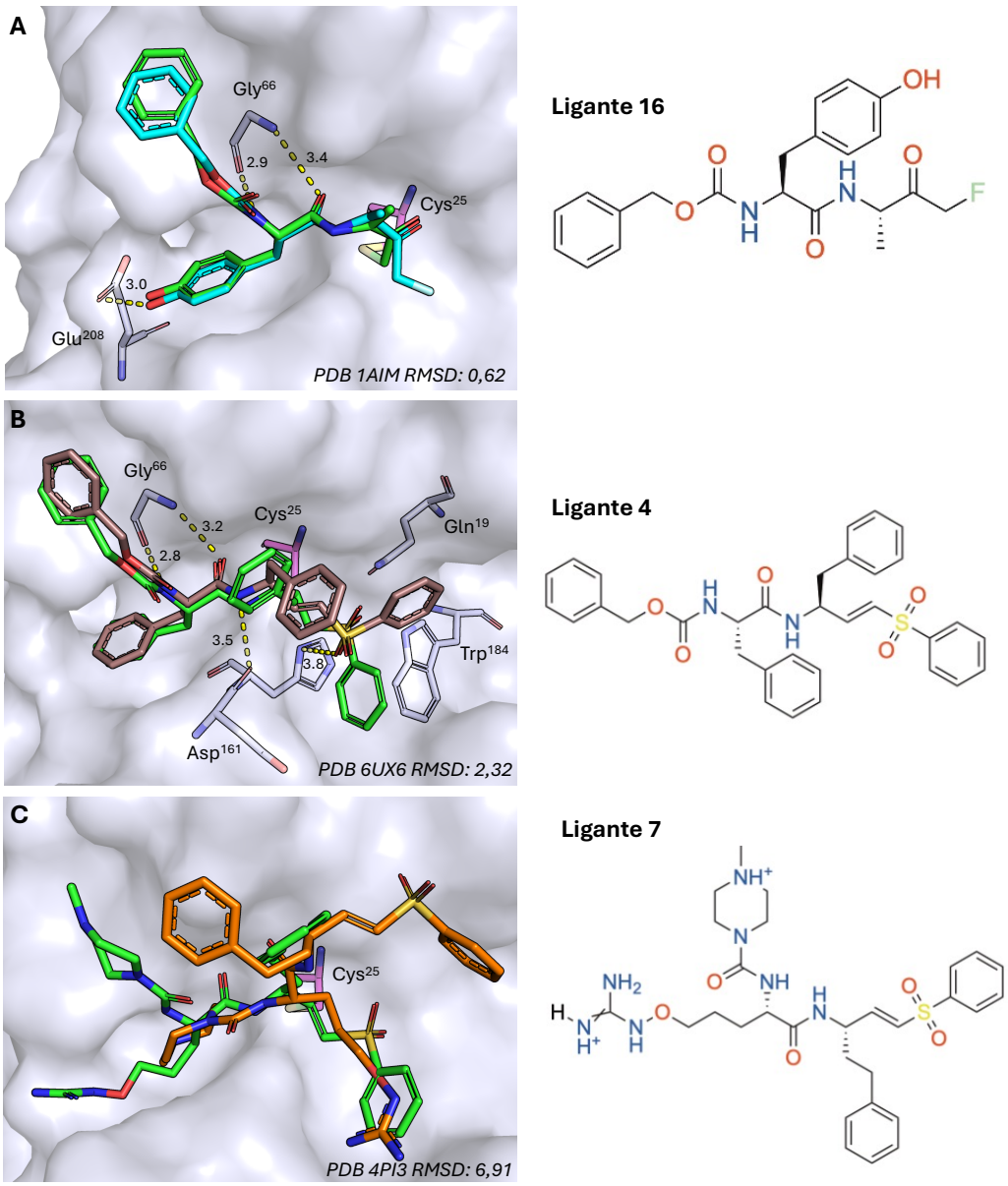


Figura 15 - Sobreposição da pose encontrada pelo *docking* e o modo de ligação cristalográfico de exemplos representativos da classificação aplicada ao *redocking*. Resultados do *redocking* para os ligantes **16**, **4** e **7** pertencentes aos PDBs: A) 1AIM), B) 6UX6 e C) 4PI3. O modo de ligação cristalográfico está representado em verde e as poses de *docking* em azul, marrom e laranja Superfície da cruzaína (czp1) destacada em azul. Interações polares com os resíduos representadas por linhas amarelas tracejadas. Resíduo de Cys25 envolvido em ligação covalente no complexo cruzaína-inibidor destacado em rosa.

Para os ligantes em que o *redocking* não conseguiu reproduzir o modo de ligação cristalográfico, investigamos se essa limitação poderia estar relacionada ao número de ligações rotacionáveis. Sabe-se que cada ligação rotacionável adiciona um novo grau de liberdade aos seis graus de liberdade padrão (três translacionais e três rotacionais), resultando em um aumento exponencial no espaço de busca (Allen *et al.*, 2015). Esse aumento dificulta a amostragem eficiente de conformações próximas ao modo cristalográfico pelo programa DOCK 6 (Allen *et*

al., 2015). Assim, analisamos a possível correlação entre valores elevados de RMSD e a flexibilidade dos compostos.

Os resultados, apresentados na **Figura 16**, indicam que não há uma correlação clara entre essas variáveis. Entre os 12 inibidores em que o modo de ligação cristalográfico foi reproduzido, observamos compostos com 9 a 17 ligações rotacionáveis e valores de RMSD < 3 Å. Por outro lado, alguns compostos com apenas 4 a 6 ligações rotacionáveis apresentaram valores de RMSD superiores a 3 Å. Esses dados sugerem que, embora a flexibilidade molecular possa representar um desafio para o *docking*, outros fatores também influenciam a capacidade do protocolo em reproduzir a pose cristalográfica com fidelidade.

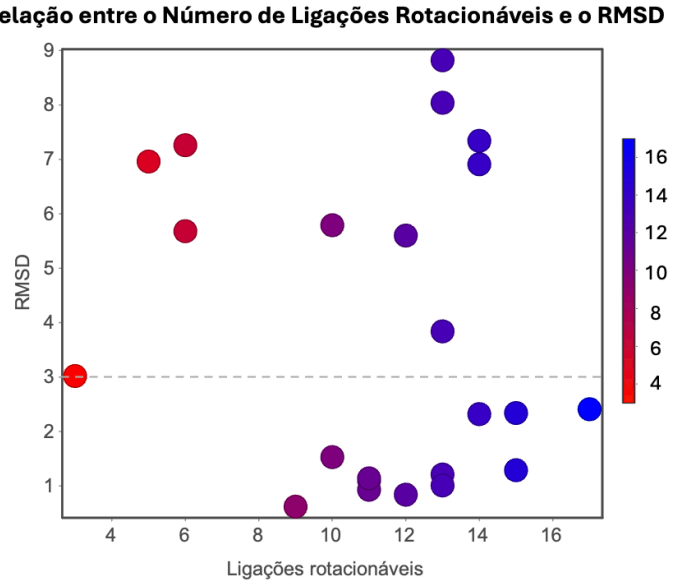


Figura 16 - Dispersão dos valores de RMSD em função do número de ligações rotacionáveis dos ligantes. Valores de RMSD obtidos no *redocking* estão representados no eixo Y. Número de ligações rotacionáveis dos compostos está representado no eixo X e na escala de cores ao lado direito do gráfico. Linha tracejada em cinza delimitando os compostos com valores de RMSD maiores ou menor que 3 Å.

4.2 Construção de modelos estruturais para as cruzipaínas

Para obter modelos da estrutura tridimensional das cruzipaínas realizamos uma modelagem comparativa utilizando o programa Modeller. A escolha desse programa se deu pela sua capacidade de realizar a transferência do ligante do molde para o modelo durante o processo de modelagem. O Modeller é capaz de extrair e aplicar restrições de distância específicas para o ligante (Šali; Blundell, 1993), contribuindo para que as cadeias laterais dos resíduos no sítio de ligação mantenham orientações que não comprometam análises subsequentes de *docking* molecular.

Para as análises de *docking* contra as cruzipaínas, foram gerados modelos a partir do molde PDB 4PI3 (vinilsulfona). Já para as simulações de dinâmica molecular, utilizamos

modelos construídos com base no PDB 1AIM (fluormetilcetona). A escolha do complexo 4PI3 como molde deve-se ao fato de seu inibidor ocupar os principais sub-sítios da cruzipaína, além de pertencer à classe das vinilsulfonas, que representam a maior porcentagem entre os ligantes cristalográficos avaliados. O complexo 1AIM, por sua vez, foi selecionado como molde pelo inibidor ser uma fluormetilcetona que ocupa o subsítios S2 e S3, possuindo um anel fenólico que interage com Glu208 na cruzaína. Dessa forma, simulações de dinâmica dos modelos gerados a partir do molde 1AIM permite avaliar os efeitos da introdução de grupos volumosos no S2 e S3, bem como a perda da interação com o Glu208 na estabilidade do complexo.

Os modelos finais passaram por um processo de validação utilizando os servidores MolProbity, ERRAT e QMEAN, que permitem avaliar a qualidade estereoquímica e estrutural das proteínas geradas.

Os parâmetros avaliados por esses servidores (**Tabela 4** e **Tabela A3**, Anexo 2) indicam que os modelos apresentam alta qualidade estrutural. O ERRAT, que fornece um fator de qualidade geral baseado em interações atômicas, apresentou valores entre 90,4 e 97,2, indicando alta confiabilidade, já que valores superiores a 50 são considerados representativos de modelos de alta qualidade. Já o QMEAN, que combina diferentes métricas para avaliar a qualidade global da estrutura, resultou em valores entre -0,31 e 0,4, sugerindo que os modelos apresentam uma qualidade comparável a estruturas experimentais de resolução semelhante.

Tabela 4 - Resultados obtidos para a validação dos modelos de cruzipaínas com Molprobity, ERRAT e Q-MEAN

		Modelo Avaliado				
Servidor	**Parâmetro**	**Molde PDB: 4PI3**	**CZP2.II.6_esmo**	**CZP3.II.7_esmo**	**CZP3.II.9_non-esmo**	**CZP4.II.7_non-esmo**
MolProbity	Ramachandran Favored[a] (%)	97,65	96,24	95,31	96,71	96,71
	Ramachandran Outliers[b] (%)	0	0,47	0	0,47	0
	Rotamer outliers[c] (%)	0.90	0,59	0,59	2,34	1,17
	C-beta deviation[d] (%)	1	0	1	0	0
	Bad Angles[e] (%)	0.24	0,22	0,17	0,18	0,13
	Bad Bonds[f] (%)	0.72	0,12	0,24	0,12	0,18

ERRAT	Quality Factor ERRAT[g]	90,5	95,1	93,1	92,7	94,2
Q-MEAN	Q-MEAN Score[h]	0,4	-0,31	0,13	0,1	0,12

Limiares do molprobity (%): [a] Bom: Favored > 95; Atenção: 98 > Favored ≥ 95; Alerta: Favorecido < 95. [b] Bom: Outlier < 0,05; Atenção: 0,05 < Outlier ≤ 0,05; Alerta: Outlier > 0,05. [c] Bom: Outlier ≤ 0,3; Atenção: 0,3 < Outliers ≤ 1,5; Alerta: Outliers > 1,5. [d] Bom: Outlier = 0; Atenção: 0 < Outliers < 5; Alerta: Outliers ≥ 5. [e] Bom: Outlier < 0,1; Atenção: 0,1 ≤ Ângulos outliers < 0,5; Alerta: Ângulos outliers ≥ 0,5. [f] Ligações outliers < 0,01; Atenção: 0,01 ≤ Ligações outliers < 0,2; Alerta: Ligações outliers ≥ 0,2. [g] Os valores variam de 0 a 100. Valores mais altos indicam menor chance de erros na estrutura. [h] O valor máximo é 1, e valores mais próximos de 1 indicam estruturas mais confiáveis.

Os gráficos de Ramachandran (**Figura 17** e **Figura A1**, Anexo 2) corroboram essa análise, indicando que os modelos gerados apresentam predominantemente resíduos em regiões permitidas. Esse gráfico realiza o mapeamento dos ângulos de torção ϕ e ψ da cadeia polipeptídica, permitindo identificar resíduos em conformações energeticamente favoráveis ou desfavoráveis. As regiões permitidas correspondem a estruturas secundárias e contêm resíduos com conformações estáveis. Por outro lado, as regiões proibidas representam conformações estericamente desfavoráveis devido a colisões entre átomos.

A análise dos gráficos gerados para os modelos revelou que não há resíduos classificados como *outliers*, com exceção das cruzipaínas 2 e 3.9, modeladas a partir do molde PDB 4PI3. Nessas estruturas, o resíduo Cys101 foi identificado como um *outlier*, localizado em uma região proibida do gráfico. No entanto, essa cisteína está situada em um loop distante do sítio ativo da enzima e não participa de interações com ligantes, o que indica que sua conformação não impacta a confiabilidade das análises realizadas com o modelo.

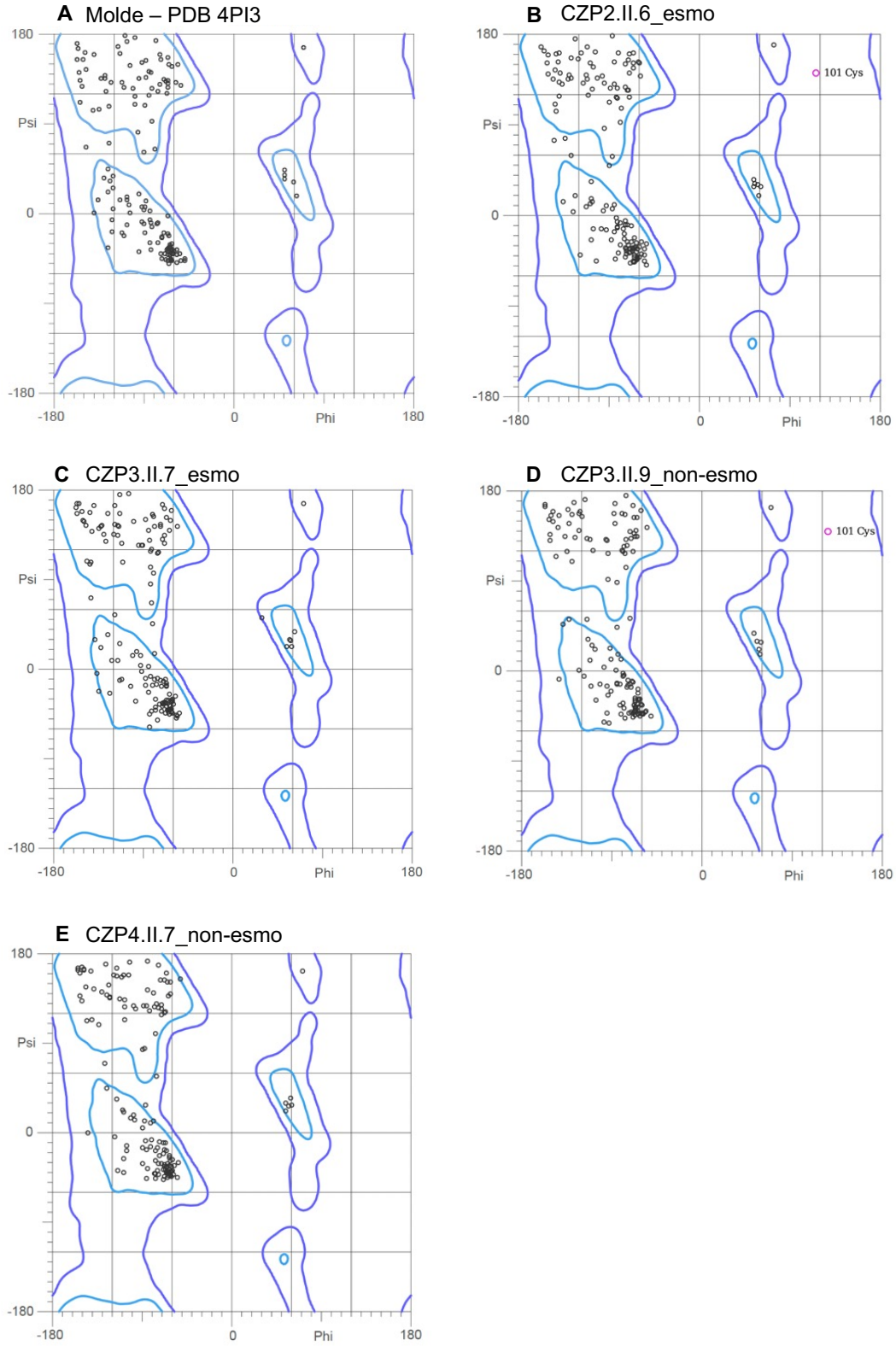


Figura 17 - Gráficos de Ramachandran para os modelos de cruzipaínas. A) Estrutura cristalográfica da cruzaína (czp1) utilizada como molde, PDB 4PI3. B-E) Modelos para as cruzipaínas dos subtipos 2, 3.7 e 3.9 e 4. O eixo x mostra os ângulos ϕ e o eixo y, os ângulos ψ. Linhas azul claro delimitam as regiões de ângulos favorecidos e as linhas azul escuro, as regiões permitidas. Os gráficos foram obtidos no servidor Molprobity.

Por fim, mapeamos os efeitos das substituições sobre a polaridade dos subsítios. Para isso, calculamos mapas de potencial lipofílico molecular (**Figura 18**). Valores de potencial

negativos indicam regiões mais hidrofílicas (cores próximas ao azul), enquanto regiões mais lipofílicas (em amarelo) são representadas por valores de potencial positivos. Podemos observar que algumas substituições impactam na polaridade do sítio ativo, como exemplo substituições no subsítio S3 e S2 que introduzem resíduos hidrofóbicos no lugar de resíduos polares. Além disso, algumas substituições introduzem aminoácidos com cadeias laterais maiores, como Phe e Trp, o que pode impactar no volume de alguns subsítios. Portanto, observamos que as substituições encontradas podem resultar em diferenças no volume e polaridade do sítio ativo das cruzipaínas.

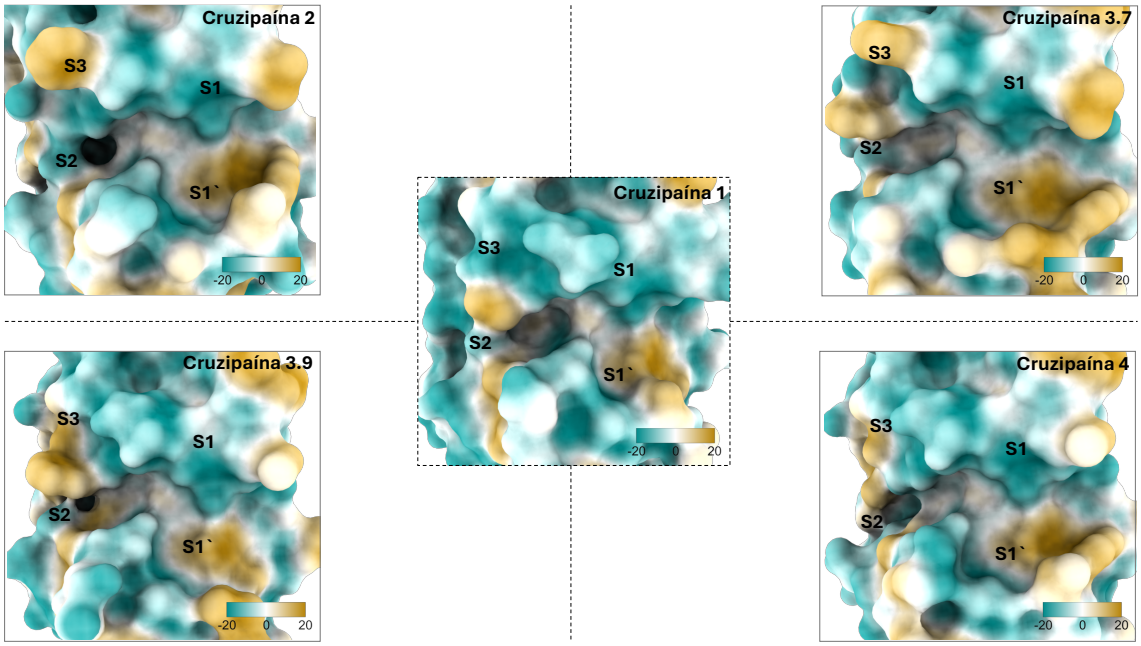


Figura 18 - Superfície das cruzipaínas colorida de acordo com potencial lipofílico molecular. Mapa de potencial lipofílico para modelos de cruzipaínas gerados a partir do molde PDB 4PI3. Os valores do potencial lipofílico variam entre -20 e 20, como representado na escala. Cores próximas ao azul (potencial negativo) representam regiões mais hidrofílicas, enquanto regiões lipofílicas (potencial positivo) são coloridas em amarelo

4.3 *Docking* molecular de compostos contra os modelos das cruzipaínas

Para a realização do *docking* molecular contra os modelos das cruzipaínas, selecionamos os ligantes para os quais o modo de ligação cristalográfico foi reproduzido com sucesso na análise de *redocking* contra a cruzaína (czp1) (RMSD < 3 Å). A escolha de incluir apenas estes compostos baseia-se na ideia de que a capacidade do protocolo de *docking* de reproduzir com precisão o modo de ligação experimental é um indicativo de maior confiabilidade nos resultados obtidos. Sendo assim, realizamos o *docking* de 12 ligantes contra modelos tridimensionais das cruzipaínas obtidos a partir do molde PDB 4PI3.

4.3.1 Vinilsulfonas

4.3.1.1 Cruzipaína 2

As vinilsulfonas consistem em uma das classes de inibidores da cruzaína mais estudadas na literatura científica. Até o momento, estão disponíveis no PDB 10 estruturas cristalográficas com ligantes desta classe, o que representa aproximadamente 37% dos complexos cruzaína-ligante registrados. Dentre elas, avaliamos 6 ligantes contra os modelos de cruzipaínas. Esses 6 ligantes foram selecionados por apresentarem sucesso no *redocking*.

Ao analisar as estruturas cristalográficas dos complexos cruzaína-vinilsulfonas, podemos identificar ligações de hidrogênio que são frequentemente observadas entre os ligantes e os resíduos Gln19, Gly66, Asp161 e Trp184, como pode ser observado para o complexo PDB 1F2C (**Figura 19A**).

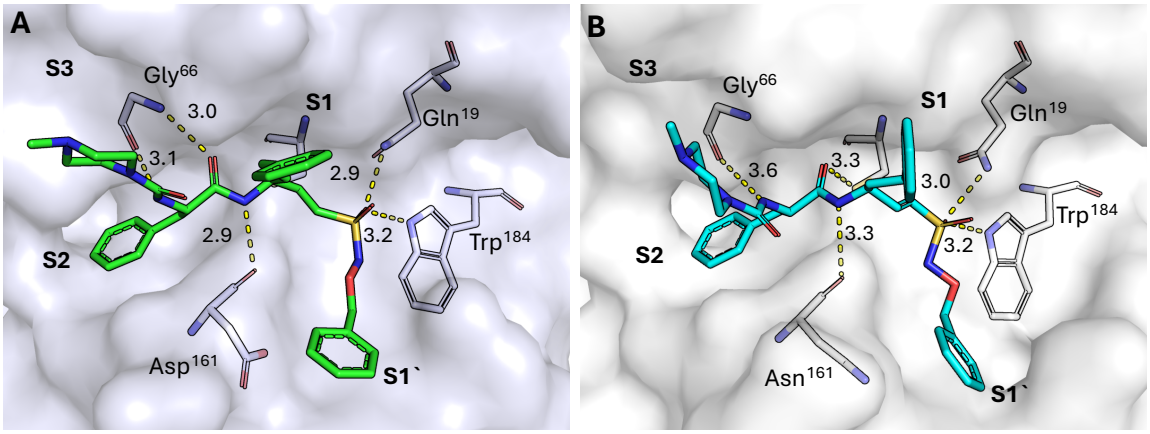


Figura 19 – Complexo cristalográfico cruzaína-vinilsulfona e resultados de *docking* do ligante 1 contra a czp2. A) Complexo PDB 1F2C. B) Pose melhor pontuada pelo *docking* do ligante **1** (PDB 1F2C) contra a czp2. Superfície da cruzaína (czp1) destacada em azul e superfície da czp2 destacada em cinza. Interações polares com os resíduos representadas por linhas amarelas tracejadas.

Dentre os resíduos que fazem interações polares com o ligante **1**, apenas Asp161 (czp1) é substituído por Asn161 (czp2) entre as cruzipaínas 1 e 2. Entretanto, apesar dessa substituição introduzir um resíduo polar neutro na czp2 no lugar de um residuo carregado negativamente na czp1, observamos que a ligação de hidrogênio com os compostos é preservada, uma vez que a interação ocorre com a cadeia principal do resíduo. Esta e algumas outras ligações de hidrogênio mencionadas são preservadas nas poses melhor ranqueadas pelo *docking* contra a czp2, como exempificado para o ligante **1** (**Figura 19B**).

As poses mais bem pontuadas pelo *docking* apresentaram uma conformação semelhante ao modo de ligação cristalográfico do complexo com a cruzaína, com pequenas variações, principalmente em grupos expostos ao solvente. Para compostos com anéis aromáticos

ocupando a maior parte do subsítio S3, observamos que nas poses melhor pontuadas estes grupos estão ligeiramente deslocados deste subsítio (**Figura 20A**, **B** e **C**). Essa alteração no posicionamento dos anéis aromáticos pode estar relacionada à substituição de Ser por Phe61 no subtipo 2. Devido ao maior volume da cadeia lateral de Phe61, sua orientação no modelo pode ocupar parte do subsítio S3, impactando no posicionamento de grupos nesta região.

Para investigar essa hipótese, realizamos o alinhamento do modelo da czp2 com o complexo cruzaína-ligante **4** (PDB 6UX6). O objetivo dessa análise foi verificar se a orientação de Phe61 no modelo estaria ocupando a mesma região onde o anel aromático se encontra no complexo cristalográfico da cruzaína. A análise realizada pelo programa Chimera identificou um choque estérico entre Phe61 e o ligante **4**, com a linha lilás na **Figura 20D** indicando o par de átomos envolvido. Além disso, é possível observar uma sobreposição parcial da superfície molecular da Phe61 e do ligante, indicando que a orientação da Phe61 no modelo ocupa parte do subsítio S3. Apesar dessa ocupação impactar o posicionamento de grupos no S3, observamos que para os ligantes **2, 3 e 4** o resultado foi apenas um leve deslocamento na posição do anel aromático. Entretanto, o impacto para outros ligantes pode ser mais expressivo, como será discutido posteriormente.

É importante destacar que as simulações de *docking* foram conduzidas com o ligante flexível, mas mantendo a proteína rígida. Sendo assim, o uso de um modelo alternativo, no qual a Phe61 adote outra orientação, poderia permitir um posicionamento distinto do anel no S3. Isso evidencia uma limitação do *docking* rígido da proteína e sugere que variações conformacionais da Phe61 podem influenciar significativamente os resultados.

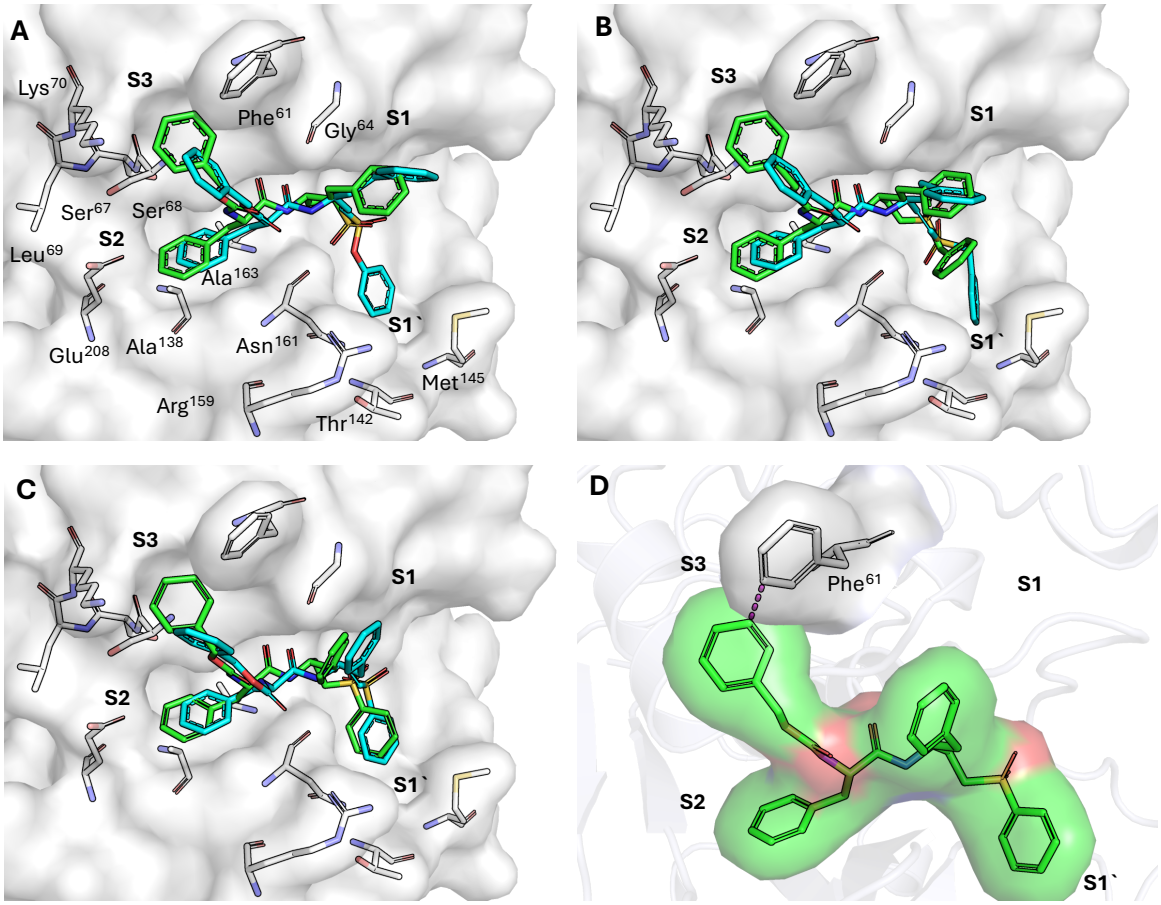


Figura 20 - Pose melhor pontuada pelo *docking* para vinilsulfonas contra a czp2. A) Pose de *docking* para o ligante **2** (PDB 1EWO), B) ligante **3** (PDB 1F2A) e C) ligante **4** (PDB 6UX6). D) Alinhamento entre o modelo de czp2 e complexo cristalográfico cruzaína-inibidor **4**, mostrando a sobreposição da superfície molecular do resíduo e anel no S3. Choque estérico entre Phe61 e ligante identificado pelo Chimera, o par de átomos envolvidos está representado por linha lilás. Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína de cada PDB (em verde), sobreposto com a pose melhor pontuada pelo *docking* (em azul) contra czp2. Principais substituições encontradas no sítio ativo da czp2 representadas em *sticks*. Superfície da czp2 destacada em cinza.

Para os ligantes **5** e **6**, as poses melhor ranqueadas não apresentaram muita similaridade com os modos cristalográficos da cruzaína (**Figura 21A** e **B**, respectivamente). Podemos observar ligações de hidrogênio com os resíduos Gln19 e His162, visto que o grupo vinilsulfona permanece posicionado no subsítio S1`. Entretanto, a principal diferença entre as poses diz respeito a posição dos anéis de morfolina (para o ligante **5**) e metilpiperazina (para o ligante **6**). Em ambos os casos, esses anéis se posicionam próximos ao subsítio S3 da cruzaína na estrutura cristalográfica. Por outro lado nas poses apontadas pelo *docking*, eles estão mais expostos ao solvente (**Figura 21**).

A príncipio, as substituições no subsítio S3 para a czp2 parecem não justificar as alterações observados para os anéis que ocupam essa região. Portanto, consideramos a hipótese de que uma pose semelhante ao modo cristalográfico poderia ser mais favorável, mas recebeu uma menor pontuação por uma falha de ranqueamento do *docking*. Para o ligante **5**, a análise

das 10 poses mais bem pontuadas não revelou nenhuma conformação semelhante ao modo de ligação cristalográfico. Entretanto, como a análise se restringiu às 10 primeiras poses, não é possível descartar que conformações mais semelhantes ao modo cristalográfico estejam presentes entre as demais poses geradas, mas com pontuações inferiores.

Por outro lado, para o ligante **6**, observamos que a pose 7 se assemelha ao modo cristalográfico (**Figura 21C**). Considerando que a melhor pontuação atribuída à pose 1 não parece ser justificada pelas substituições no S3, pode se assumir que houve uma falha no ranqueamento. Neste caso, a conformação mais favorável seria a pose 7, semelhante à cristalográfica. Isso é corroborado pelo ligante **1**, que também possui um grupo metilpiperazina e cuja pose melhor pontuada é compatível com o modo de ligação experimental na cruzaína (**Figura 21D**).

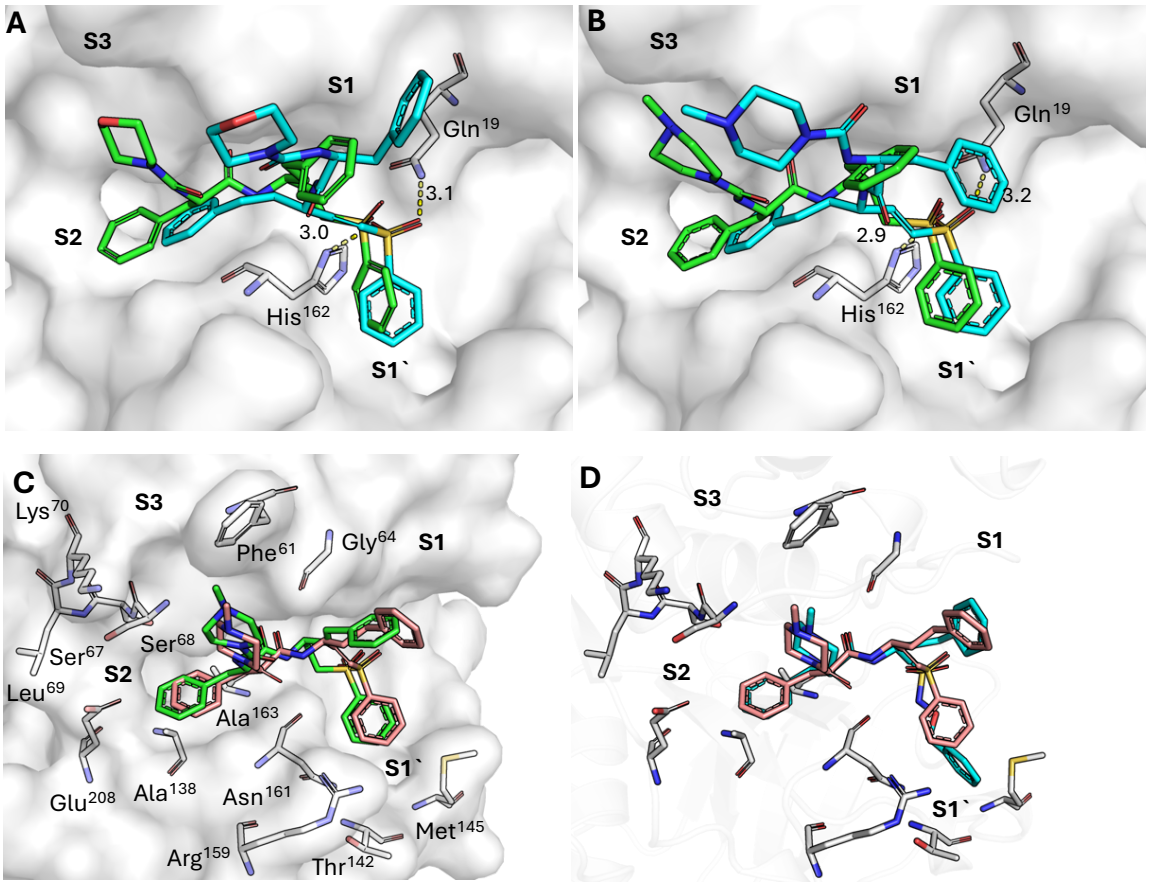


Figura 21 - Resultados de *docking* dos ligantes 5 e 6 contra czp2. A) Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína PDB 1F29 (em verde) e melhor pose encontrada pelo *docking* para o ligante **5** (PDB 1F29) (em azul). B) Modo de ligação do complexo vinilsulfona-cruzaína PDB 2OZ2 (em verde) e melhor pose encontrada pelo *docking* para o ligante **6** (PDB 2OZ2) (em azul). C) Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína PDB 2OZ2 (em verde) e a pose 7 encontrada pelo *docking* para o ligante **6** (em rosa). D) Sobreposição da pose melhor pontuada para o ligante **1** (em azul) e a pose 7 encontrada pelo *docking* para ligante **6**. Principais substituições encontradas no sítio ativo da czp2 representadas em *sticks*. Superfície da czp2 destacada em cinza.

Semelhante ao observado para a czp2, os resultados de *docking* para as cruzipaínas 3.7 e 3.9 indicam que as ligações de hidrogênio com os resíduos Gln19, Gly66, Asp161, His162 e Trp187 observadas para as estruturas da cruzaína são também preservadas nas cruzipaínas 3 (**Figura 22**). Além disso, apesar de Asp161 ser substituído por Ser161 nas czps 3.7 e 3.9, a ligação de hidrogênio entre a cadeia principal e o ligante é preservada.

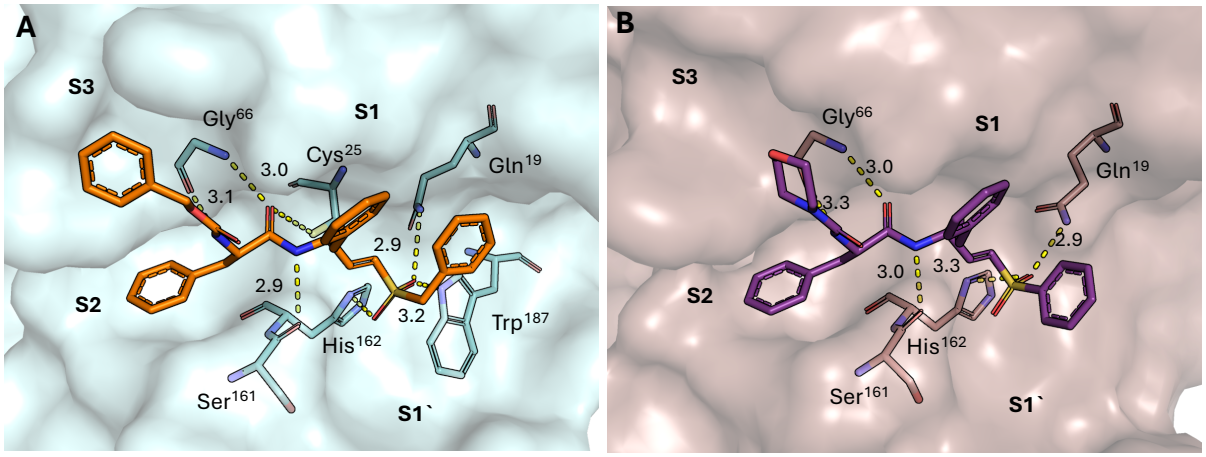


Figura 22 - Resultados de *docking* para os ligantes 3 e 5 contra as cruzipaínas 3. A) Pose melhor pontuada pelo *docking* para o ligante **3** contra czp3.7. B) Pose melhor pontuada pelo *docking* para o ligante **5** contra czp3.9

Semelhante à czp2, os anéis aromáticos no S3 da czp3.7 também estão ligeramente deslocados (**Figura 23A**, **C** e **E**). No entanto, nesse caso, essa diferença na posição não é resultado de choques estéricos com Phe61, mas possivelmente da presença de Trp67. Ambos os resíduos podem estabelecer interações do tipo π com o anel aromático no S3, o que pode influenciar seu posicionamento. Por outro lado, na czp3.9, onde Ser61 é preservada, o anel aromático está posicionado no S3 de forma mais semelhante ao modo cristalográfico e em uma orientação que favorece interações do tipo π com Trp67 (**Figura 23B**, **D**, **F**).

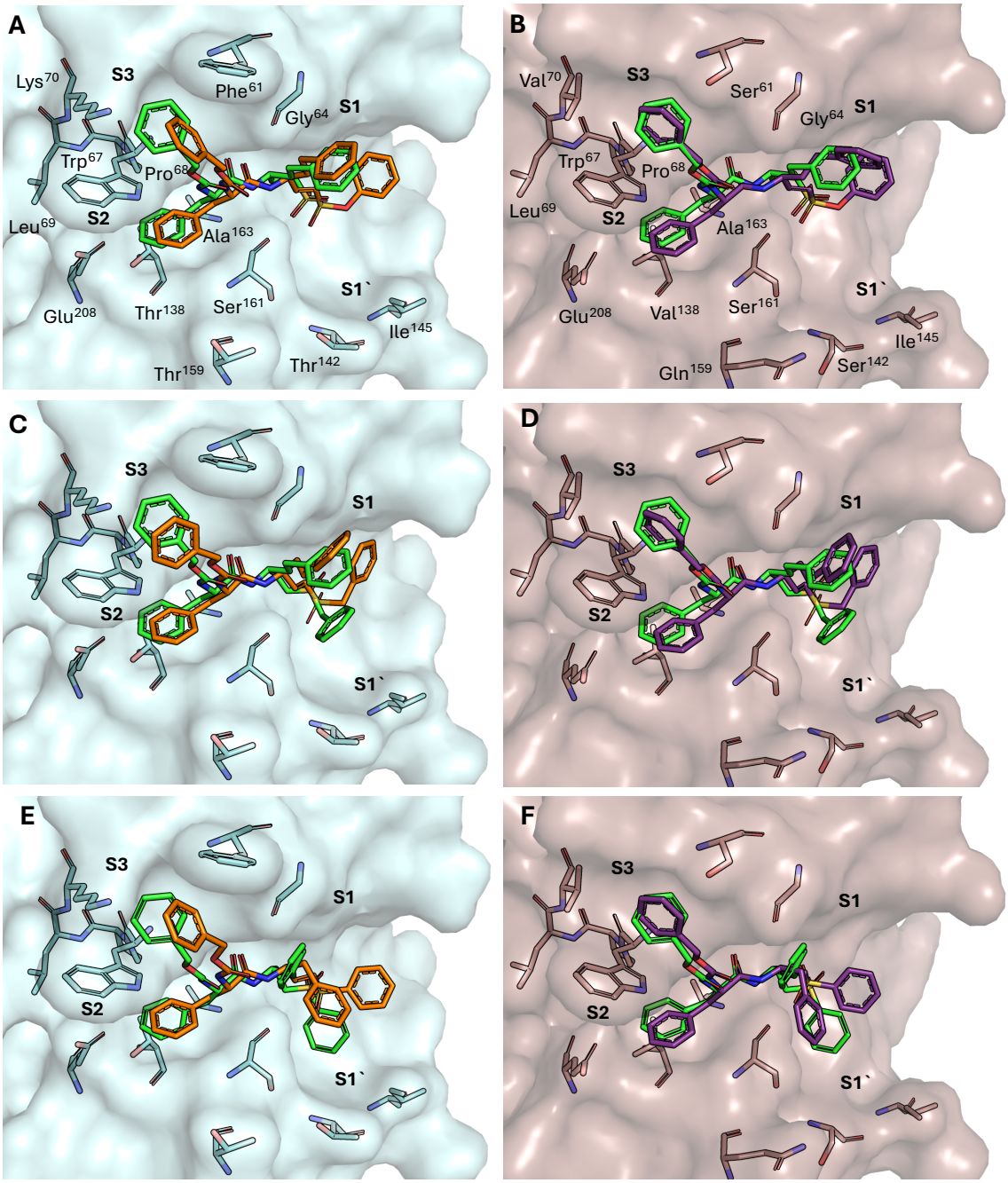


Figura 23 - Resultados de *docking* para os ligantes 2, 3 e 4 contra as cruzipaínas 3. A e B) Pose melhor pontuada pelo *docking* para o ligante **2**, C e D) ligante **3**, E e F) ligante **4** contra czp3.7 (laranja) e czp3.9 (roxo). Superfície da czp3.7 destacada em azul e czp3.9 em vermelho. Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína representado em verde. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

Para os ligantes **5** e **6**, observamos poses semelhantes à cristalográfica da cruzaína (**Figura 24A** e **B**). Nas cruzipaínas 3.7 e 3.9, as substituições de Leu67 e Met68 por Trp67 e Pro68 não afetam a polaridade do S2, o que contribui para a similaridade da pose encontrada com a estrutura cristalográfica (**Figura 24C** e **D**).

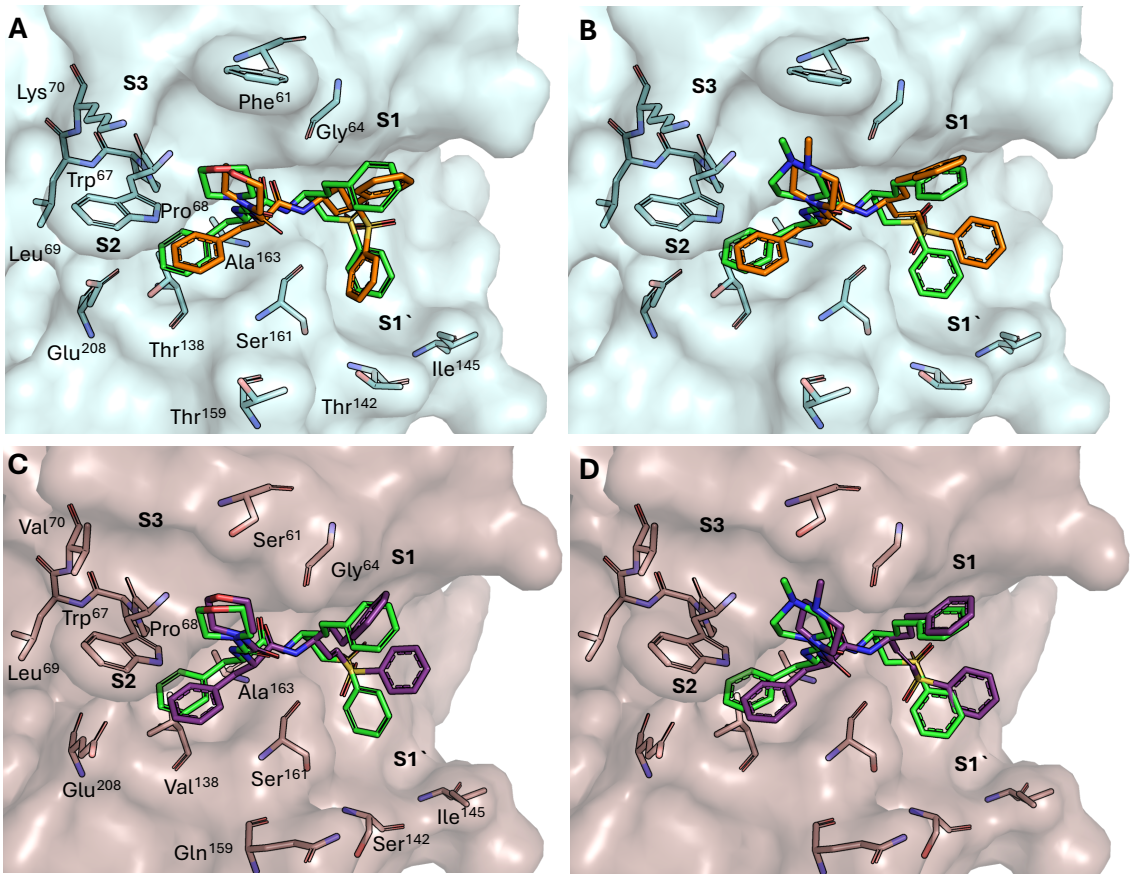


Figura 24 - Resultados de *docking* para os ligantes 5 e 6 contra as cruzipaínas 3. A) Pose melhor pontuada pelo *docking* contra czp3.7 (laranja) para o ligante **5** e B) ligante **6**. C) Pose melhor pontuada pelo *docking* contra czp3.9 (roxo) para para o ligante **5** e D) ligante **6**. Superfície da czp3.7 destacada em azul e czp3.9 em vermelho. Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína representado em verde. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

4.3.1.2 Cruzipaína 4

Para a czp4 observamos que os ligantes **1**, **3** e **4** tiveram poses semelhantes a cristalográfica para a cruzaína (**Figura 25A**, **B** e **C**, respectivamente.). Para o ligante **1**, a pose melhor pontuada parece mais similar, enquanto as poses para os outros 2 ligantes possuem sobreposição do anel no S2, mas pequena diferença no posicionamento dos anéis no S3. Para as cruzipaínas 2 e 3.7, alterações quanto a posição dos anéis no S3 podem ser possivelmente explicadas pela presença da Phe61 e Trp67. Entretanto, na czp4, a Ser61 é preservada assim como na czp3.9. Portanto a diferença na posição do anel não pode ser explicada apenas pelo resíduo que ocupa a posição 61 ou 67. Com relação ao S2, os anéis foram posicionados de forma semelhante ao modo cristalográfico para a cruzaína. No entanto, a substituição do resíduo Glu208 por uma glicina resulta em um S2 mais raso e exposto, o que pode afetar a afinidade do inibidor pela cruzipaína.

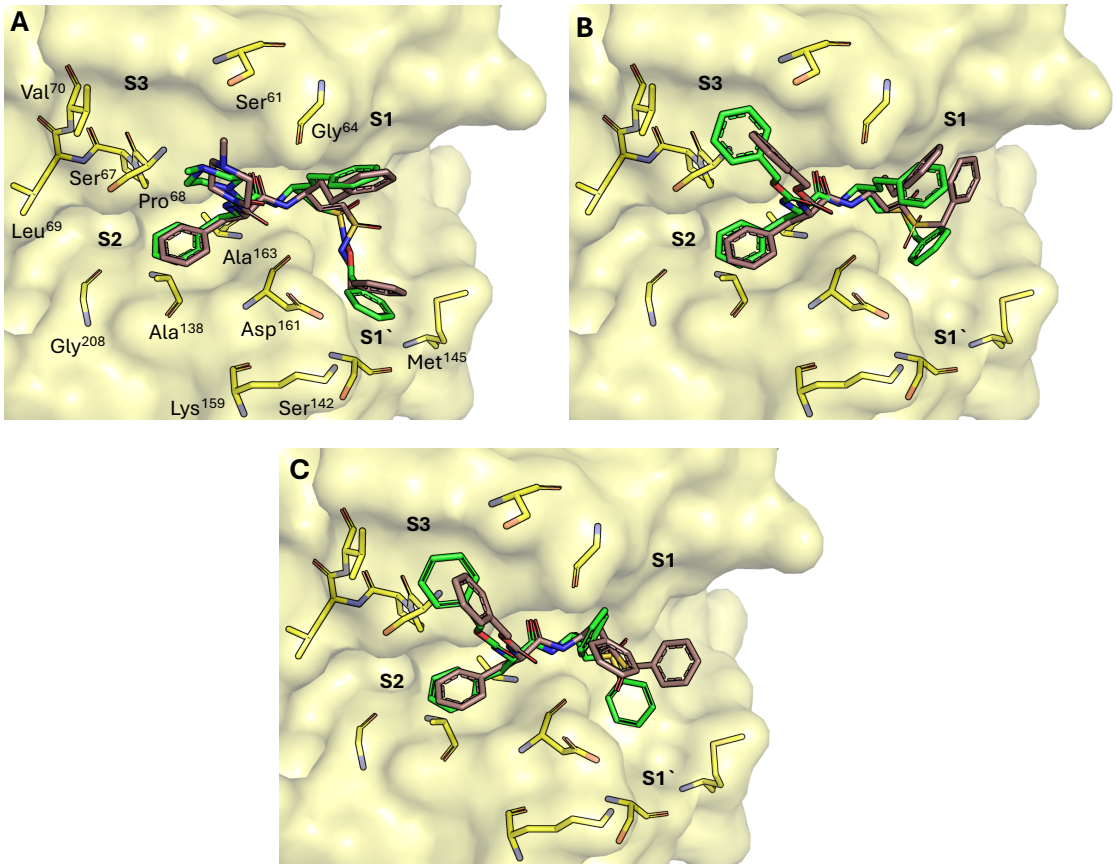


Figura 25 – Resultados de *docking* para os ligantes 1, 3 e 4. A) Pose melhor pontuada para o ligante **1**, B) ligante **3** e C) ligante **4**. Pose melhor pontuada em marrom e modo de ligação cristalográfico para a cruzaína em verde. Superficie da czp4 representada em amarelo e principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

Para os ligantes **5** e **6**, as poses melhor ranqueadas diferem do modo de ligação cristalográfico observado na cruzaína (**Figura 26A** e **B**, respectivamente). Assim como observado para a czp2, levantamos a hipótese de que essas diferenças podem estar relacionadas a falhas no ranqueamento das poses pelo *docking*. No caso do ligante **5**, nenhuma das 10 poses mais bem pontuadas apresentou semelhança com o modo cristalográfico. Em contraste, para o ligante **6**, foi possível identificar uma pose semelhante ao modo experimental - a oitava melhor ranqueada -, com as interações de hidrogênio preservadas e o anel de metilpiperazina adequadamente posicionado no subsítio S3 (**Figura 26C**).

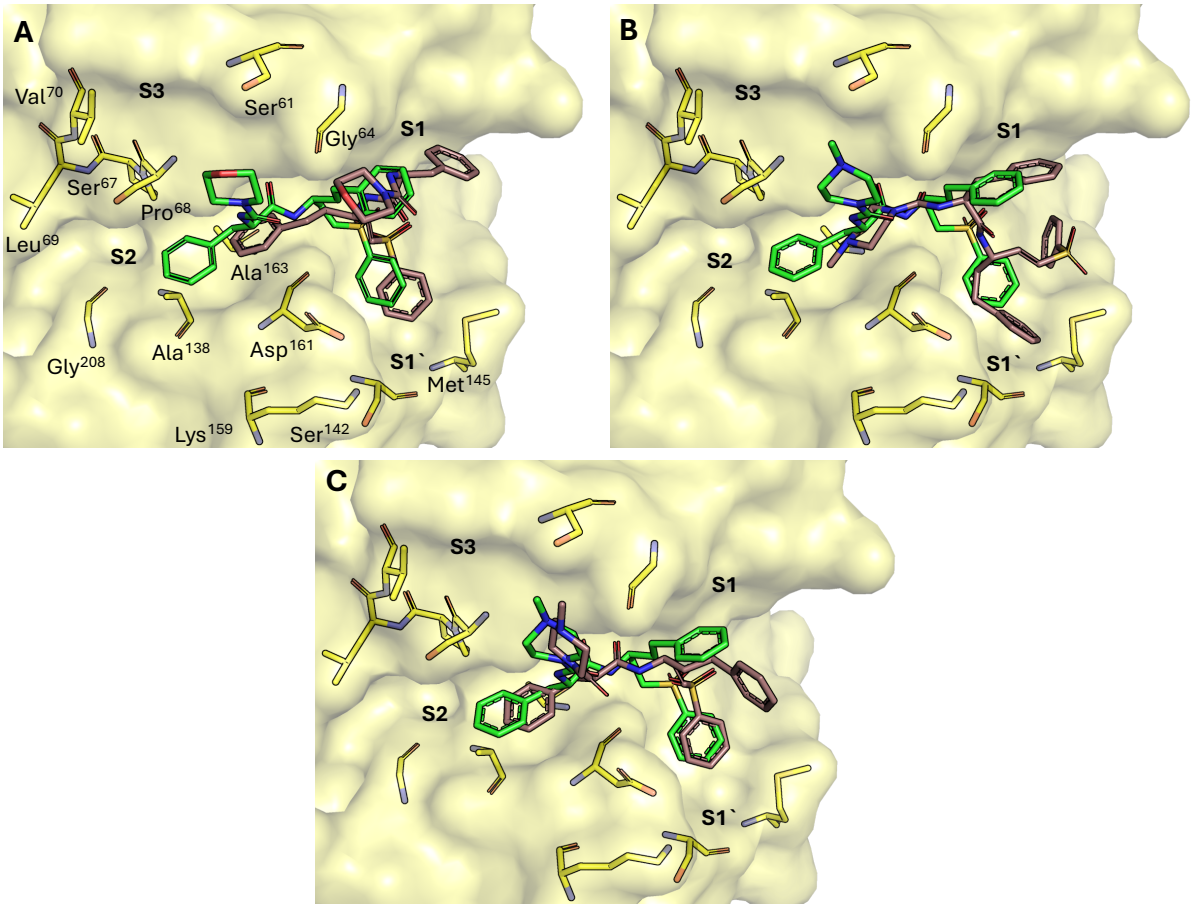


Figura 26 - Resultados de *docking* para os para o ligante 5 e 6. A) Pose melhor pontuada contra czp4 (marrom) para o ligante **5**. B) Pose melhor pontuada para o ligante **6** C) Pose 8 para o ligante **6**. Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína (verde). Superficie da czp4 representada em amarelo. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

4.3.2 Epóxidos

Para o complexo cruzaína-epóxido (PDB 1EWM) podemos observar ligações de hidrogênio entre o inibidor e os resíduos His162, Gly66 e Cys25 (**Figura 27A**). Ao analisar a pose melhor pontuada pelo *docking* contra a czp2, observamos ligações de hidrogênio com os resíduos Gln19 e Trp187. Adicionalmente, o grupo que ocupa o subsítio S3 na cruzaína está deslocado em direção ao subsítio S1 na czp2 (**Figura 27B**). Considerando que para as vinilsulfonas observamos choque estérico entre Phe61 e anéis aromáticos no S3, realizamos a mesma análise para o ligante **11**. De fato, foi identificado choque estérico entre pares de átomos do ligante e Phe61, destacados pela linha em lilás na **Figura 27C**.

Além disso, dentre as 10 poses mais bem ranqueadas, observamos que em 8 delas o grupo epóxido se apresenta distante da Cys25, ocupando o subsítio S1' (**Figura 27D**). Essa mudança pode ser explicada por alterações na polaridade do S1` devido a troca de um resíduo polar carregado negativamente (Asp161) por um resíduo polar não carregado (Asn) e a introdução de um resíduo carregado positivamente (Arg159).

Para a czp3.7, observamos que a pose melhor pontuada se distingue do modo de ligação cristalográfico (**Figura 27E**). Como observado para as vinilsulfonas, a orientação de Phe61 no modelo da czp3.7 não gera choque estérico, permitindo que o ligante ocupe o subsítio S3. Além disso, a análise das 10 poses mais bem ranqueadas revelou que a pose 7 apresenta uma orientação semelhante à do complexo cristalográfico da cruzaína (**Figura 27F**). A melhor pontuação atribuída à pose 1 não parece estar justificada pelas interações nos subsítios S3 e S2, sugerindo uma possível falha no ranqueamento das poses. Adicionalmente, espera-se que, em um modo de ligação mais favorável, o grupo epóxido seja posicionado no subsítio S1, próximo à Cys25. A posição em relação ao resíduo de cisteína é importante para que a ligação covalente possa ser formada. Assim, apesar de não ter recebido a melhor pontuação no ranqueamento, a pose 7 pode representar a conformação mais favorável para o ligante **11**

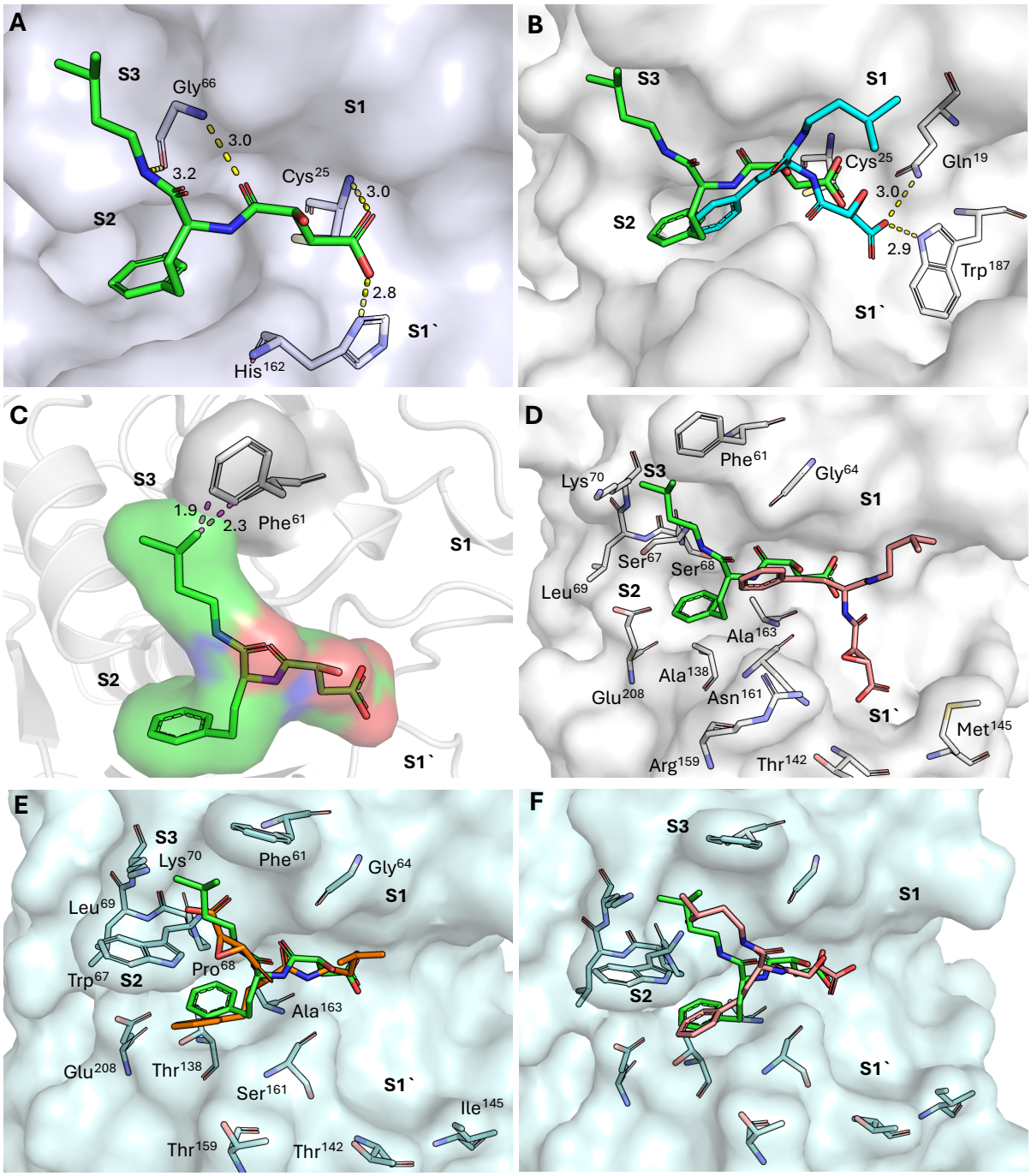


Figura 27 - Resultados de *docking* para o ligante 11 contra as czps 2 e 3.7. A) Modo de ligação cristalográfico epóxido-cruzaína PDB 1EWM. B) Pose melhor pontuada pelo *docking* contra a czp2 (azul). C) Alinhamento entre o modelo de czp2 e complexo cristalográfico cruzaína-inibidor **11**, mostrando a sobreposição da superfície molecular do resíduo e grupo no S3. Choque estérico entre Phe61 e ligante identificado pelo Chimera, os pares de átomos envolvidos estão representado por linhas pontilhadas em lilás. D) Pose 3 contra a czp2 (rosa). E) Pose melhor pontuada pelo *docking* contra a czp3.7 (laranja). F) Pose 7 contra a czp2 (rosa). Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína em verde. Superficie da cruzaína em azul claro, superficie da cruzipaína 2 em cinza e superfície da cruzipaína 3.7 em azul claro.

Já para a czp3.9, todas as 10 poses melhores ranqueadas foram semelhantes entre si, mas diferentes do modo cristalográfico para a cruzaína. Apesar do anel arómatico posicionado no S2, o epóxido se encontra no subsítio S3 a 8,4 Å da Cys25, o que implica em um modo de

ligação desfavorável a ligação covalente (**Figura 28A**). Com relação a czp4, em nenhuma das 10 poses, o epóxido é posicionado próximo a Cys25, e o anel aromático também não se encontra no subsítio S2 (**Figura 28B**). A substituição de Glu208 por Gly resultando em um S2 mais raso e exposto pode ser uma explicação para a não amostragem do anel aromático no S2, visto que o Glu208 é essencial para a acomodação de grupos hidrofóbicos e carregados positivamente na cruzaína.

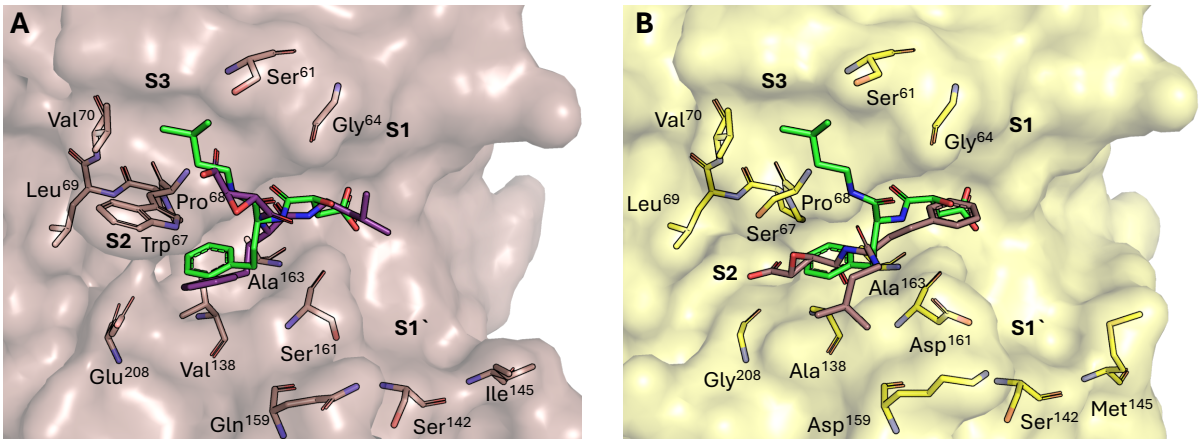


Figura 28 - Resultado de *docking* para o ligante 11 contra a czp3.9 e czp4. Pose melhor pontuada para a czp3.9 (em roxo) e para czp4 (em marrom). Modo de ligação cristalográfico para a cruzaína (em verde). Superficie da czp3.9 representada em vermelho e da czp4 em amarelo. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

4.3.3 Galinamida

Ao analisar a estrutura cristalográfica cruzaína-galinamida (PDB 7JUJ) podemos observar ligações de hidrogênio entre o ligante **14** e os resíduos Asp161, Gly66 e Gln19 e a ocupação dos subsítios S1', S1, S2, S3 e S4 (**Figura 29A** e **B**). A pose melhor pontuada para a czp2 (**Figura 29C**) é semelhante ao modo cristalográfico para a cruzaína, com ligações de hidrogênio com Gln19, Gly66 e Asn161. Além disso, o posicionamento do grupo enona no S1' mantém a possibilidade da ligação covalente com a Cys25. Para czp3.9 observamos um padrão similar, diferindo apenas pela ausência de ligação de hidrogênio com Ser61 (**Figura 29E**).

Com relação as cruzipaínas 3.7 e 4, as poses encontradas pelo *docking* são semelhantes entre si e distintas do modo cristalográfico para a cruzaína (**Figura 29D** e **F**, respectivamente). O grupo enona ocupa o subsítio S2, o que torna esta pose desfavorável para a formação da ligação covalente pela distância da Cys25. Além disso, observamos ligação de hidrogênio apenas com Ser161 na czp4. Ao inspecionar as 10 poses melhores ranqueadas, nenhuma apresentou similaridade com o modo cristalográfico, sugerindo que as substituições podem afetar na interação deste inibidor com as cruzipaínas 3.7 e 4.

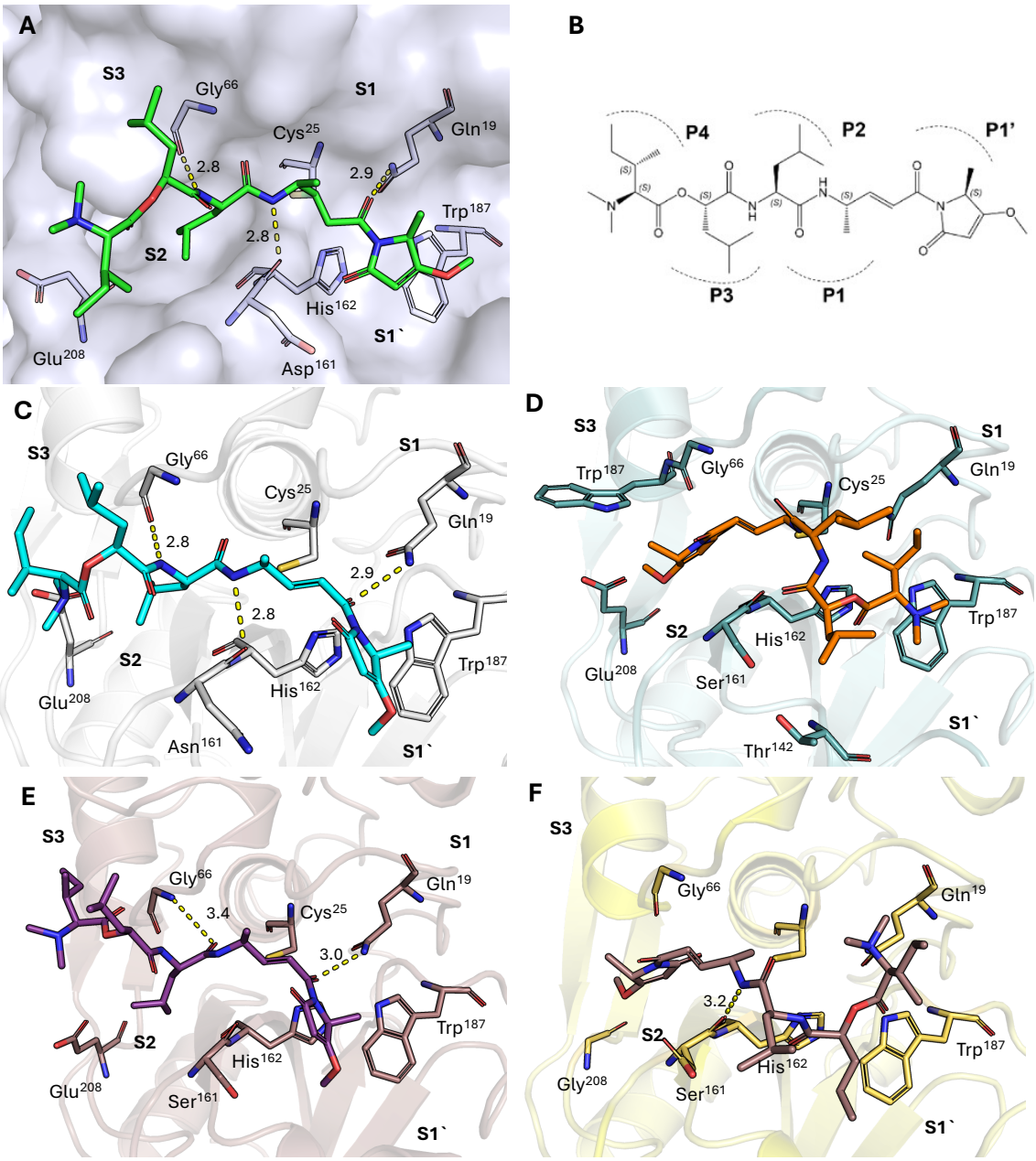


Figura 29 - Resultado de *docking* para o ligante 14 contra os diversos subtipos de cruzipaínas. A) Complexo cristalográfico PDB 7JUJ. B) Estrutura química da gallinamida, ligante **14**, e nomenclatura de Schechter-Berger. Pose melhor pontuada pelo *docking* contra C) czp2, D) czp3.7, E) czp3.9 e F) czp4. Interações polares representadas por linhas amarelas tracejadas.

4.3.4 Fluormetilcetonas

Os ligantes **15** e **16** são fluormetilcetonas pertencentes aos complexos cruzaína-inibidor PDB 1EWP e 1AIM, respectivamente. Ao analisar essas estruturas observa-se que estes inibidores ocupam principalmente os subsítios S3 e S2 realizando ligações de hidrogênio com resíduos como Gly66, Asp161, Cys25 e Glu208 (**Figura 30A** e **B**).

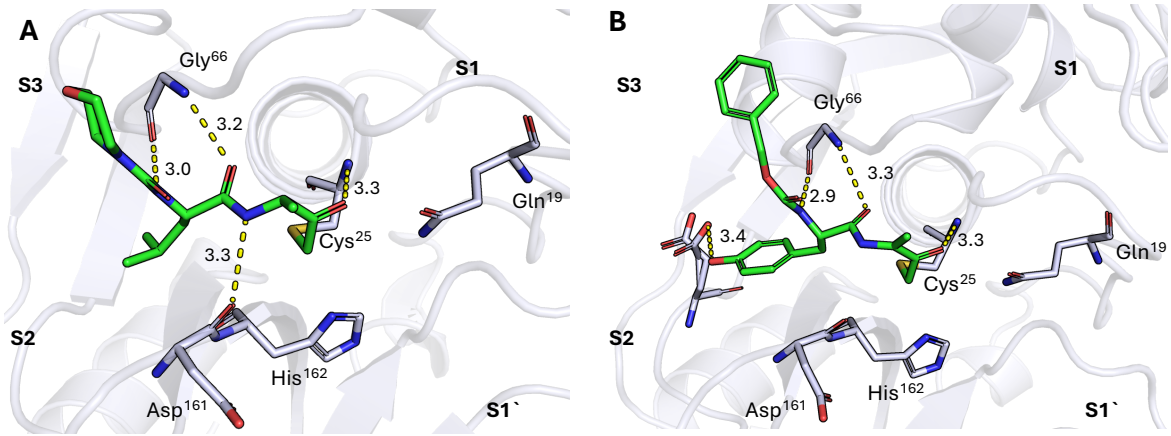


Figura 30 – Estrutura cristalográfica dos complexos PDB 1EWP e 1AIM. A) Modo de ligação cristalográfico contra a cruzaína para o complexo 1EWP (ligante **15**) e B) 1AIM (ligante **16**). Interações polares representadas por linhas amarelas tracejadas

Ao analisar os resultados de *docking* para o ligante **15** contra as czps 2 e 3.7, observamos que o anel de morfolina, posicionado na região do S2 e S3 na cruzaína, está ocupando a interface S1`/S1 na czps (**Figura 31A** e **C**). Como discutido para o ligante **5** - uma vinilsuflona que também possui um grupo morfolina -, essas poses melhor pontuadas podem refletir uma falha de ranqueamento. Isso porque, as substituições observadas no subsítio S3 não explicam o reposicionamento do grupo morfolina.

Para o ligante **16** a pose melhor pontuada contra a czp2 não posicionou nenhum anel aromático no S3 e o grupo fenol não ocupou o subsítio S2 (**Figura 31B**). Esse comportamento é consistente com o observado para outros inibidores que possuem anéis aromáticos ocupando a maior parte do S3. Da mesma forma, o *docking* do ligante **16** contra a czp 3.7 resultou em uma pose semelhante à obtida para a czp2 (**Figura 31D**), o que pode ser explicado pela presença de Phe61 em ambos os subtipos.

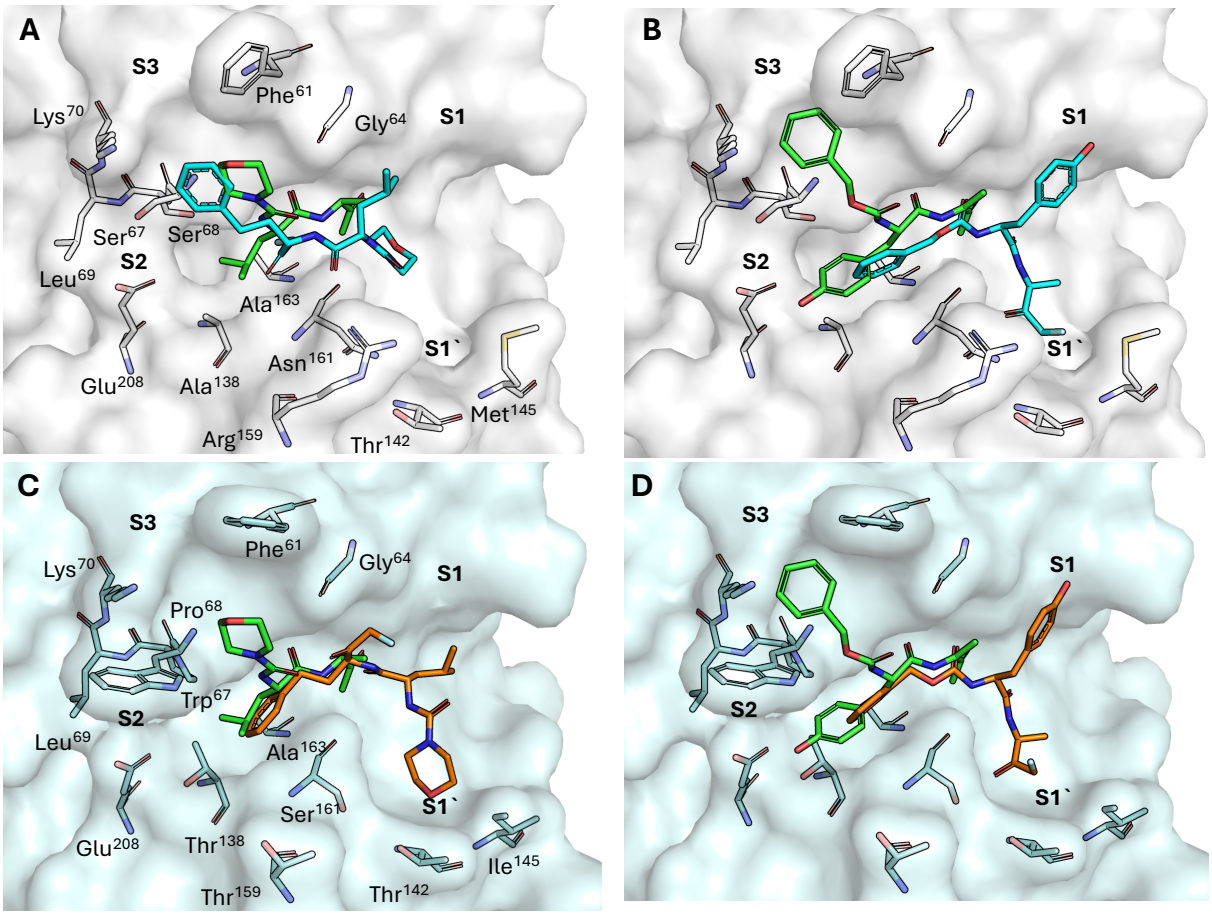


Figura 31 - Resultado de *docking* para os ligantes 15 e 16 contra as cruzipaínas 2 e 3.7. A) Pose melhor pontuada para o ligante **15** e B) ligante **16** contra a czp2. C) Pose melhor pontuada para o ligante **15** e D) ligante **16** contra a czp3.7. Modo de ligação cristalográfico para os complexos representado em verde. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

Para a czp3.9, a segunda pose melhor pontuada para o ligante **15** foi semelhante ao modo cristalográfico para a cruzaína (**Figura 32A**), com o anel morfolina e demais grupos ocupando os subsítios correspondentes. Para o ligante **16**, a pose melhor pontuada foi semelhante ao modo cristalográfico (**Figura 32B**). Esse subtipo não possui Phe na posição 61, portanto não há uma cadeia lateral grande que possa afetar o posicionamento do anel no S3 e consequentemente resultar em uma pose distinta.

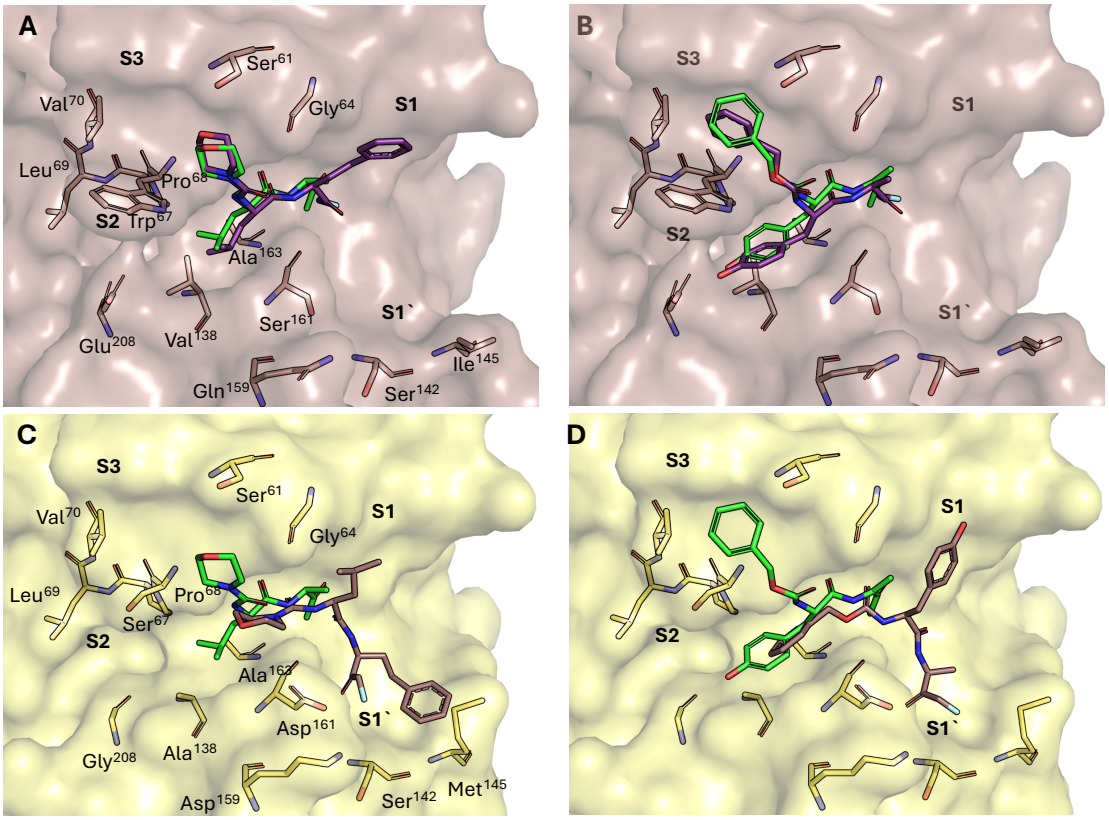


Figura 32 - Resultado de *docking* para os ligantes 15 e 16 contra as cruzipaínas 3.9 e 4. A) Pose melhor pontuada para o ligante **15** e B) ligante **16** contra a czp3.9. C) Pose melhor pontuada para o ligante **15** e D) ligante **16** contra a czp4. Modo de ligação cristalográfico para os complexos representado em verde. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

Para a czp4, as melhores poses para os ligantes **15** e **16** foram diferentes do modo cristalográfico para a cruzaína (**Figura 32C** e **D**, respectivamente). A princípio, as substituições no subsítio S3 parecem não justificar a pose melhor pontuada. No entanto, outras substituições, como a mudança de Glu208 para Gly no S2 podem também impactar na pose encontrada. Por exemplo, na cruzaína o Glu208 realiza ligação de hidrogênio com a hidroxila fenólica do ligante **16**. Ao alterar este resíduo para Gly, a possibilidade de se estabelecer uma ligação de hidrogênio é perdida, dificultando o posicionamento do fenol no S2. Além disso, a mudança no formato e volume do sítio também pode impactar na pose encontrada.

4.3.5 Hidroximetilcetona

Os ligantes **20** e **21** são hidroximetilcetonas pertencentes aos complexos PDB 1ME4 e 1ME3. Estes inibidores ocupam os subsítios S2 e S3 da cruzaína realizando ligações de hidrogênio com resíduos como Ser61, Gly66, Asp161, His162 e Glu208 (**Figura 33A** e **B**).

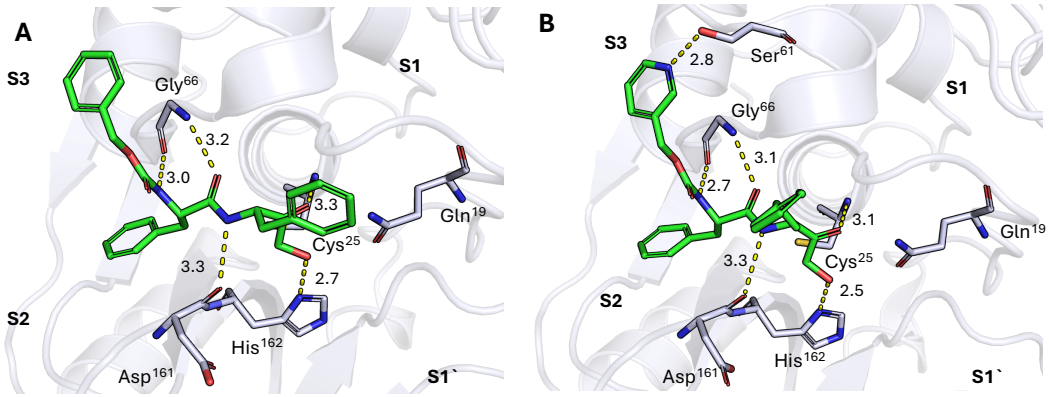


Figura 33 - Estrutura cristalográfica dos complexos PDB 1ME4 e 1ME3. A) Modo de ligação cristalográfico contra a cruzaína para o complexo 1ME4 (ligante **20**) e B) 1ME3 (ligante **21**). Interações polares representadas por linhas amarelas tracejadas.

Para a czp2, observamos novamente o impacto de Phe61 na acomodação de grupos no S3 (**Figura 34A**, **B**). No complexo cruzaína-ligante **21**, o inibidor forma uma ligação de hidrogênio com Ser61 (**Figura 34C**). Nas czp2 e czp3.7, a substituição de Ser61 por Phe61 resulta na perda dessa interação. Contudo, a troca de Asn70 por Lys70 permite a formação de uma nova ligação de hidrogênio com o inibidor (**Figura 34D**), compensando a perda da interação anterior causada pela introdução de Phe61.

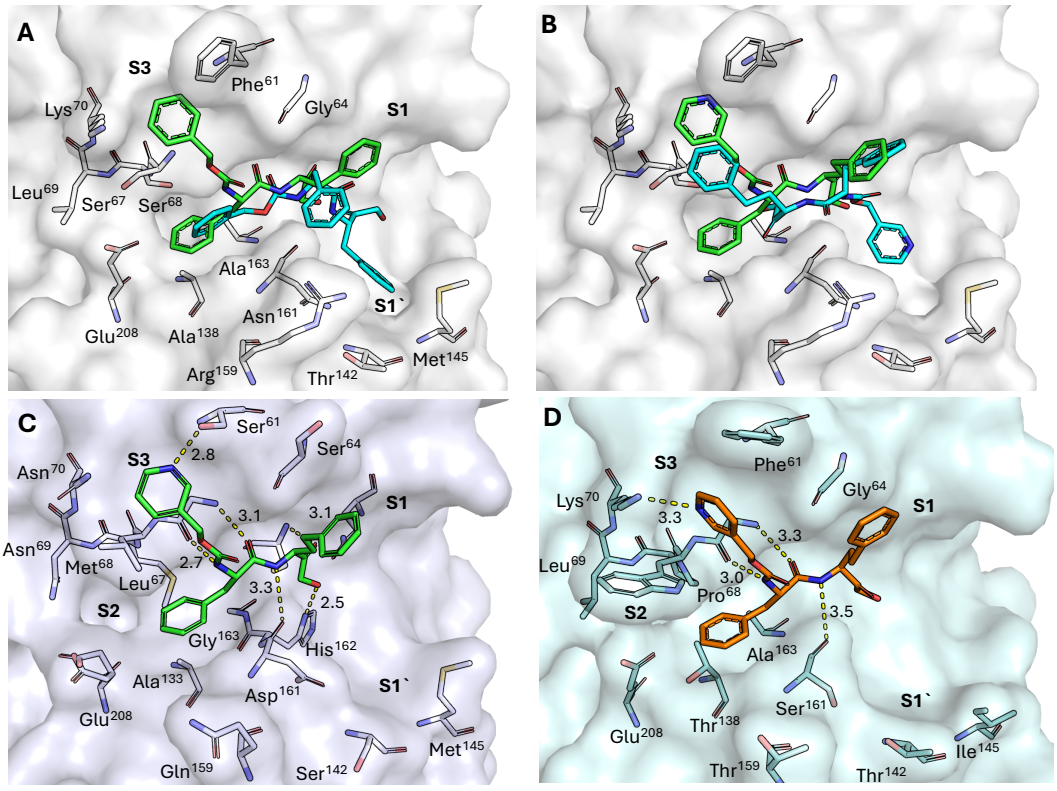


Figura 34 - Resultado de *docking* para os ligantes 20 e 21 contra as cruzipaínas 2 e 3.7. A) Pose melhor pontuada para o ligante **20** e B) ligante **21** contra a czp2. C) Complexo cruzaína-inibidor **21** D) Pose melhor pontuada para o ligante **21** contra a czp3.7. Modo de ligação cristalográfico para os complexos representado em verde. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*.

Para a czp3.9, as poses mais bem pontuadas foram semelhantes ao modo cristalográfico para ambos os inibidores (**Figura 35A** e **B**), com os anéis posicionados nos sítios correspondentes e a ligação de hidrogênio com a Ser61 preservada. Para a czp4, as poses foram distintas ao modo cristalográfico para a cruzaína (**Figura 35C** e **D**). Em geral, as substituições podem afetar o modo de ligação representado pela pose melhor pontuada. Por exemplo, a mudança de Glu208 por Gly afeta o volume do S2, além disso este é um resíduo reconhecidamente importante para a acomodação de grupos hidrofóbicos neste subsítio (Gillmor; Craik; Fletterick, 1997), portanto a ausência deste pode ter grande impacto nos resultados de *docking*.

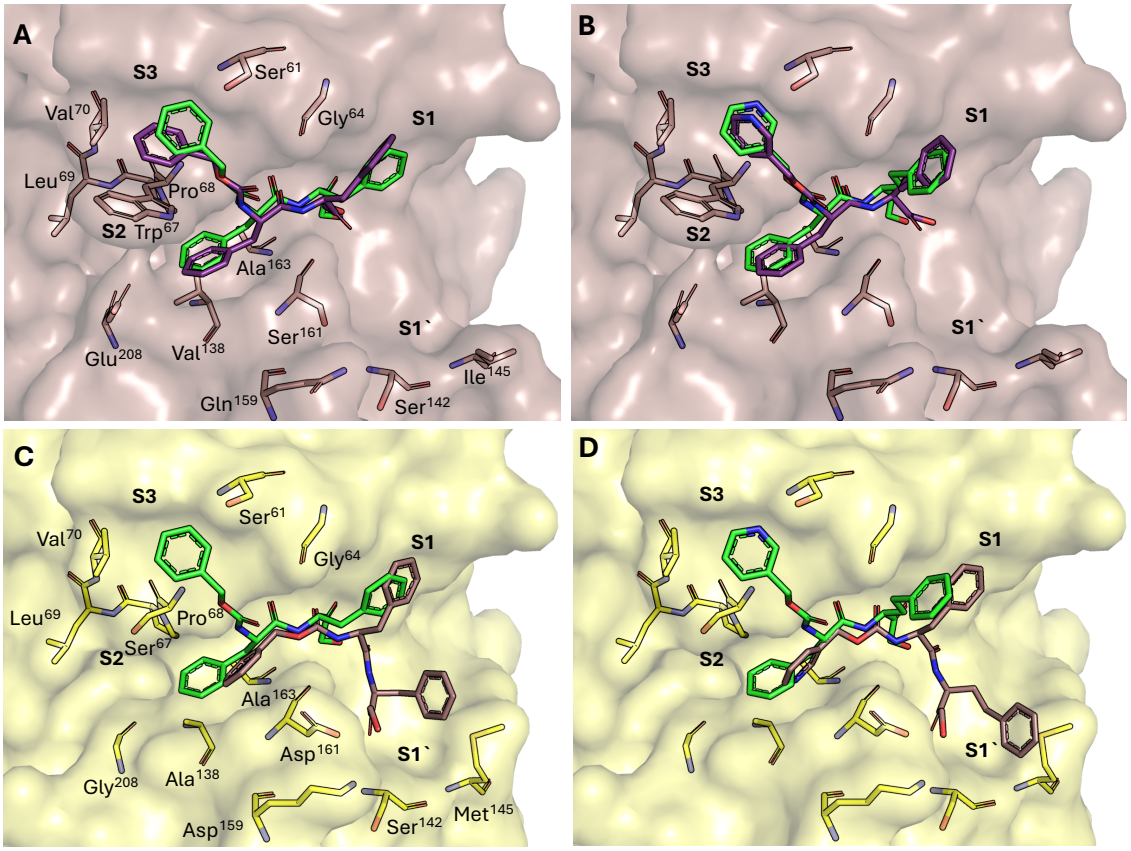


Figura 35 - Resultado de *docking* para os ligantes 20 e 21 contra as cruzipaínas 3.9 e 4. A) Pose melhor pontuada para o ligante **20** e B) ligante **21** contra a czp3.9. C) Pose melhor pontuada para o ligante **20** e D) ligante **21** contra a czp4. Modo de ligação cristalográfico para os complexos representado em verde. Principais substituições encontradas no sítio ativo das cruzipaínas representadas em *sticks*

Por fim, as principais alterações observadas entre os subtipos de cruzipaínas e o impacto na interação com inibidores estão apresentadas na **Tabela 5.**

Tabela 5 - Impacto das substituições nas cruzipaínas avaliado através das simulações de *docking* molecular

Alteração	Resultado	Cruzipaínas	Ligantes
Substituição de resíduo na posição 161	Ligação de hidrogênio entre inibidor e a cadeia principal do resíduo é mantida	Czp2, Czp3.7 e Czp3.9	Ligante **1, 2, 3, 4, 5, 6** (vinilsulfonas). **11** (epóxido), **14** (galinamida), **15, 16** (fluormetilcetonas) **20, 21** (hidroximetilcetonas)
Substituição de Ser61 por Phe61	Afeta o posicionamento de grupos no subsítio S3, principalmente devido a orientação deste resíduo no modelo avaliado	Czp2	Ligante **1, 2, 3, 4, 5, 6** (vinilsulfonas). Ligante **11** (epóxido). Ligante **15** e **16** (fluormetilcetonas) e **20** e **21** (fluormetilcetonas).
	Perda de ligação de hidrogênio com grupo piridina de inibidor que ocupa o S3	Czp2 e Czp3.7	Ligante **21** (fluormetilcetonas)
Substituição de Ser61 por Phe61 e Leu67 por Trp67	Pode afetar a orientação de anéis aromáticos no S3, resultando em orientações que favoreçam interações do tipo pi com estes resíduos	Czp3.7	Ligante **1, 2, 3** e **4** (vinilsulfonas).
Substituição de Leu67 por Trp67		Czp3.9	Ligante **1, 2, 3 e 4** (vinilsulfonas). Ligante **16** (fluormetilcetona). Ligante **20** e **21** (hidroximetilcetonas)
Substituição de Asn70 por Lys70	Possibilita ligação de hidrogênio com anel de piridina no S3	Czp2 e Czp3.7	Ligante **21** (fluormetilcetonas)
Substituição de Glu208 por Gly	S2 mais extenso e raso, pode afetar na acomodação de grupos neste subsítio.	Czp4	Ligante **5** e **6** (vinilsulfona), **11** (epóxido), **15** e **16** (fluormetilcetonas), **20, 21** (hidroximetilcetonas)

4.4 *Rescoring* dos complexos gerados a partir das simulações de *docking* molecular

As funções de pontuação utilizadas no *docking* geralmente envolvem simplificações na modelagem das interações moleculares, reduzindo seu custo computacional. No entanto, frequentemente negligenciam efeitos importantes, como a dessolvatação do ligante e da proteína. Como resultado, a pontuação atribuída pelo *docking* não reflete com precisão a energia real de um complexo proteína-inibidor.

Em contrapartida, o método MM-PBSA estima a energia livre de ligação utilizando um modelo contínuo para representar os efeitos de solvatação. Embora menos preciso do que abordagens mais rigorosas, como perturbação de energia livre (FEP) e integração termodinâmica (TI), é amplamente utilizado em estudos biomoleculares devido ao seu menor custo computacional (Wang, Changhao *et al.*, 2018). No entanto, o MM-PBSA apresenta limitações importantes, sendo uma delas a natureza de método *end-point*, que considera apenas os estados inicial e final da interação, sem levar em conta os estados intermediários e possíveis mudanças conformacionais (Roux; Chipot, 2024; Wang, Changhao *et al.*, 2018). Apesar dessas simplificações, o método é frequentemente empregado para reavaliar resultados de *docking.* Diante disso, utilizamos o web servidor Fast Amber *Rescoring* para reavaliar as poses de *docking* melhor pontuadas com o método MM-PBSA. Além disso, pontuamos os complexos cristalográficos dos inibidores com a cruzaína para fins comparativos.

De modo geral, os complexos com a czp1 apresentaram pontuações mais favoráveis em relação aos outros subtipos de cruzipaínas (**Figura 36**). Esse resultado corrobora com o fato de essas estruturas serem derivadas de complexos cristalográficos. A partir da análise das pontuações e da similaridade das poses com os modos cristalográficos, investigamos a existência de uma correlação entre melhores pontuações e maior similaridade estrutural. Para os subtipos czp4 e czp3.7, as melhores pontuações do *rescoring* foram obtidas para os ligantes cujas poses se assemelhavam ao modo cristalográfico. Para czp4, esse padrão foi observado para os ligantes **1**, **3** e **4** (PDB 1F2C, 1F2A e 6UX6, respectivamente), enquanto para czp3.7, foi identificado para os ligantes **1**, **3**, **5**, e **6** (PDB 1F2C, 1F2A, 1F29 e 2OZ2) (**Figura 36A**). No entanto, observamos que essas pontuações ainda foram menos favoráveis quando comparadas às atribuídas aos complexos cristalográficos correspondentes. Esse resultado sugere que, em alguns casos, apesar da amostragem de poses semelhantes à conformação cristalográfica, a afinidade entre a cruzipaína e o inibidor pode variar. Assim, embora a similaridade estrutural seja um fator relevante, ela não garante necessariamente as melhores pontuações de energia.

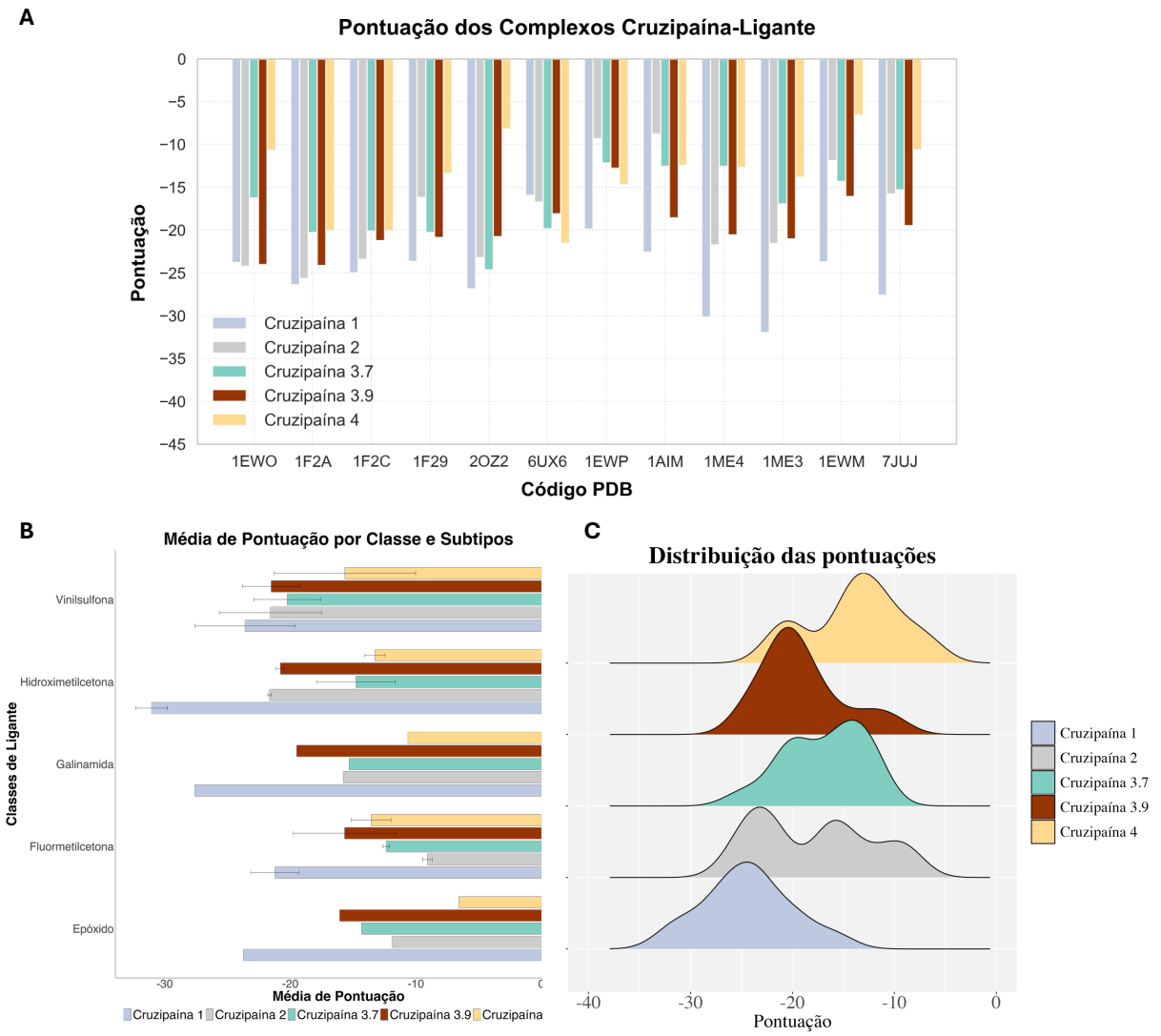


Figura 36 - Análises dos resultados de *rescoring* pelo método de MM-PBSA. A) Pontuações do *rescoring* para a melhor pose de *docking* contras os subtipos de cruzipaínas. No eixo X estão os códigos dos complexos cristalográficos do inibidor com a cruzaína (czp1). B) Média das pontuações por classes de compostos para cada cruzipaína. C) Densidade da distribuição das pontuações para os diferentes subtipos de cruzipaínas.

Por fim, a análise das pontuações sugere que as substituições presentes nos subtipos de czp podem influenciar na afinidade por inibidores. Isso pode ser observado nas diferentes médias de pontuação por classes de inibidores (**Figura 36B**), bem como na distribuição das pontuações (**Figura 36C**). Por exemplo, para a czp3.9 observamos pontuações mais favoráveis comparado a czp4 e czp3.7, o que pode sugerir que alterações para estes subtipos podem resultar em menor afinidade por inibidores.

Entretanto, é importante considerar as limitações do método MM-PBSA na interpretação desses resultados. Esse método se baseia em aproximações, como a consideração apenas do estado inicial e final do sistema para o cálculo de energia, bem como a representação

implícita do solvente de forma implícita, o que impacta a acurácia das energias calculadas. Dessa forma, pequenas diferenças de energia entre os subtipos podem não ser estatisticamente significativas, sendo necessário cautela na generalização das tendências observadas. Diante dessas limitações, métodos mais rigorosos, como perturbação de energia livre (FEP) e integração termodinâmica (TI), poderiam fornecer estimativas mais precisas da energia de ligação. Além disso, a validação experimental por meio de ensaios de inibição enzimática ou calorimetria de titulação isotérmica (ITC) seria fundamental para confirmar as tendências previstas computacionalmente e compreender melhor as diferenças na afinidade dos compostos entre os subtipos de cruzipaínas.

4.5 Dinâmica molecular de inibidor contra os subtipos de cruzipaínas

De modo complementar, com o objetivo de avaliar como as substituições encontradas nas cruzipaínas poderiam afetar a estabilidade de um potencial complexo cruzipaína-inibidor, realizamos simulações de dinâmica molecular utilizando o programa GROMACS. O ligante **16** (PDB 1AIM) foi selecionado para esta análise. Este inibidor pertence à classe das fluormetilcetonas, e sua escolha foi baseada principalmente na ocupação dos subsítios S2 e S3, além da interação do anel fenólico com o resíduo Glu208 na cruzaína. Dessa forma, foi possível avaliar os efeitos das substituições nesses subsítios que resultam em mudanças de polaridade ou na introdução de resíduos com cadeias laterais grandes, bem como o papel da interação com o Glu208. A czp1 não foi incluída nas simulações devido a erros na preparação do sistema pelo CHARMM-GUI. No entanto, sua inclusão seria relevante para a análise, uma vez que o ligante **16** está originalmente em complexo com czp1. Assim, futuramente, novas abordagens serão exploradas para possibilitar a simulação desse subtipo, de modo a fornecer uma referência mais completa para a comparação dos resultados obtidos.

O cálculo de RMSD é feito entre os *frames* da simulação, que correspondem a conformações do sistema registradas em intervalos regulares ao longo do tempo. Essa métrica reflete as distâncias entre os átomos correspondentes da pose inicial e das conformações adquiridas pelo ligante durante a simulação, permitindo avaliar sua estabilidade sítio ativo da proteína (Lemkul, 2024). Já a clusterização das conformações geradas ao longo da dinâmica molecular foi realizada pelo Chimera, com o objetivo de identificar as conformações mais amostradas do sistema cruzipaína-inibidor. Utilizando a métrica de RMSD, as conformações foram agrupadas em *clusters* e aquele com o maior número de conformações foi considerado o *cluster* mais populoso, também chamado de mais representativo.

4.5.1 Cruzipaína 2

A fim de avaliar a estabilidade do complexo czp2-ligante, a variação conformacional do ligante **16** ao longo da simulação foi analisada pelo cálculo de RMSD.

Como mostrado no vídeo do Anexo 3 e nas **Figuras 37A** e **B**, o composto se mantém no sítio ativo da cruzipaína 2 durante os 100 ns de simulação em todas as réplicas. Essa estabilidade é refletida nas baixas oscilações de valores de RMSD (0,1 a 0,7 nm) ao longo da simulação (**Figura 37A**) As substituições encontradas na cruzipaína 2 parecem, portanto, não comprometer a estabilidade do complexo ao longo do tempo simulado.

Ao analisar o cluster mais populoso da réplica 1, o resíduo Phe61 adota uma orientação que não está direcionada para o subsítio S3 (**Figura 37C**). Em contraste, no segundo cluster mais populoso, o Phe61 está orientado para o S3, possivelmente interagindo com o anel aromático do composto (**Figura 37D**). Essas variações na orientação da Phe61 indicam que, apesar da flexibilidade do resíduo, as diferentes orientações não comprometem significativamente a interação entre o composto e a czp2, uma vez que as poses permaneceram semelhantes ao longo da simulação.

Além disso, no cluster mais populoso, verificamos que o grupo fenol do composto assume uma orientação na qual a hidroxila se posiciona no interior do subsítio S2, formando ligações de hidrogênio com a cadeia principal da Ser68 (**Figura 37C**). Essa orientação do grupo fenol no subsítio S2 pode estar associada à mudança de polaridade introduzida pela substituição de Leu67 e Met68 por resíduos de serina.

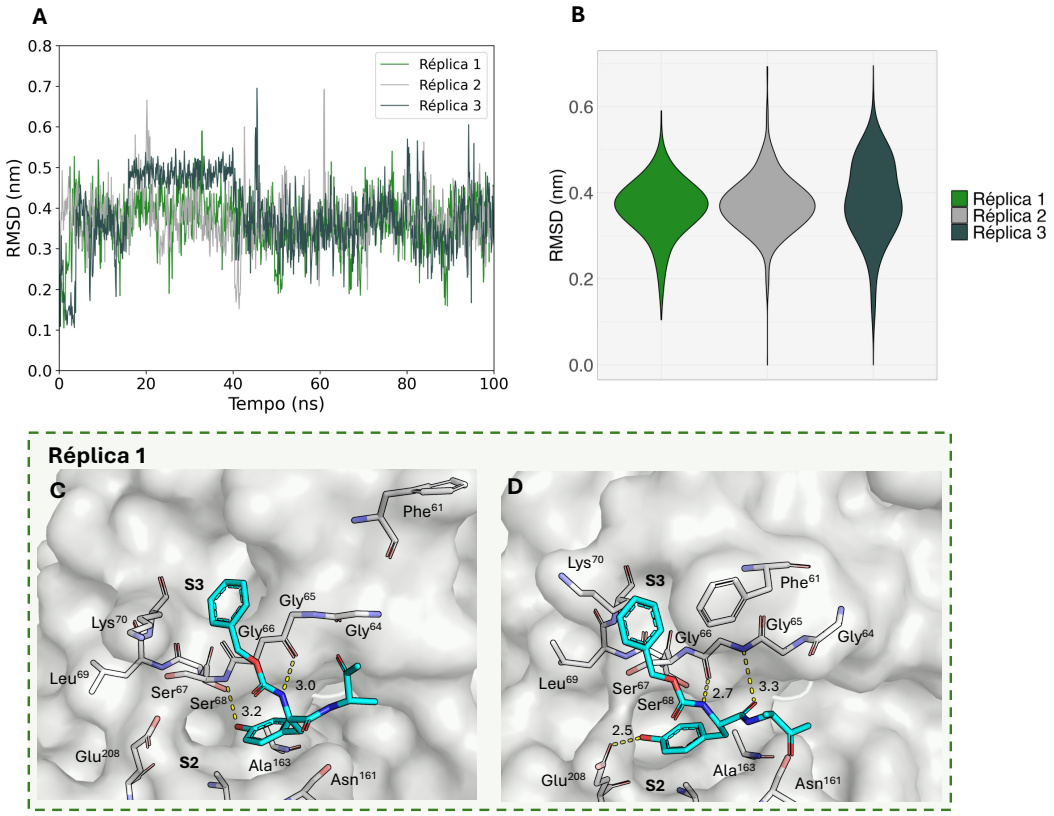


Figura 37 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 em complexo com a czp2. A) Valores de RMSD para o ligante ao longo de 100 ns de simulação para 3 réplicas. B) Distribuição dos valores de RMSD ao longo da simulação para as 3 réplicas. C) Cluster 1 (47 frames) e D) cluster 2 (39 frames) para a réplica 1 da simulação de dinâmica molecular contra a czp2

4.5.2 Cruzipaína 3.7

A análise da dinâmica molecular para a czp3.7 revelou um comportamento distinto em comparação à czp2. A estabilidade do composto no sítio ativo da czp3.7 foi distinta para as três réplicas (**Figura 38A** e **B**)

Na réplica 1, o composto permaneceu no sítio ativo por aproximadamente 35 ns e, posteriormente, saiu do sítio. O segundo cluster mais populoso corresponde a esse período da simulação, durante o qual o composto se mantém no sítio ativo realizando ligações de hidrogênio com os resíduos Gly66 e Asp161 (**Figura 38C**). Vale ressaltar que a orientação dos resíduos Phe61 e Trp67 parecem permitir interações do tipo π com o anel aromático posicionado no S3, bem como o posicionamento do grupo fenol no S2 (**Figura 38C**).

Entretanto, ao analisar o cluster mais populoso que mostra o composto fora do sítio ativo, o resíduo Trp67 assume uma orientação que ocupa grande parte do subsítio S2 (**Figura 38D**). Essa mudança na orientação pode desfavorecer o posicionamento do grupo fenol no S2, devido a um impedimento estérico. Além disso, ao assumir essa nova orientação, o Trp67

impede a formação da ligação de hidrogênio entre a hidroxila do grupo fenol e o resíduo Glu208.

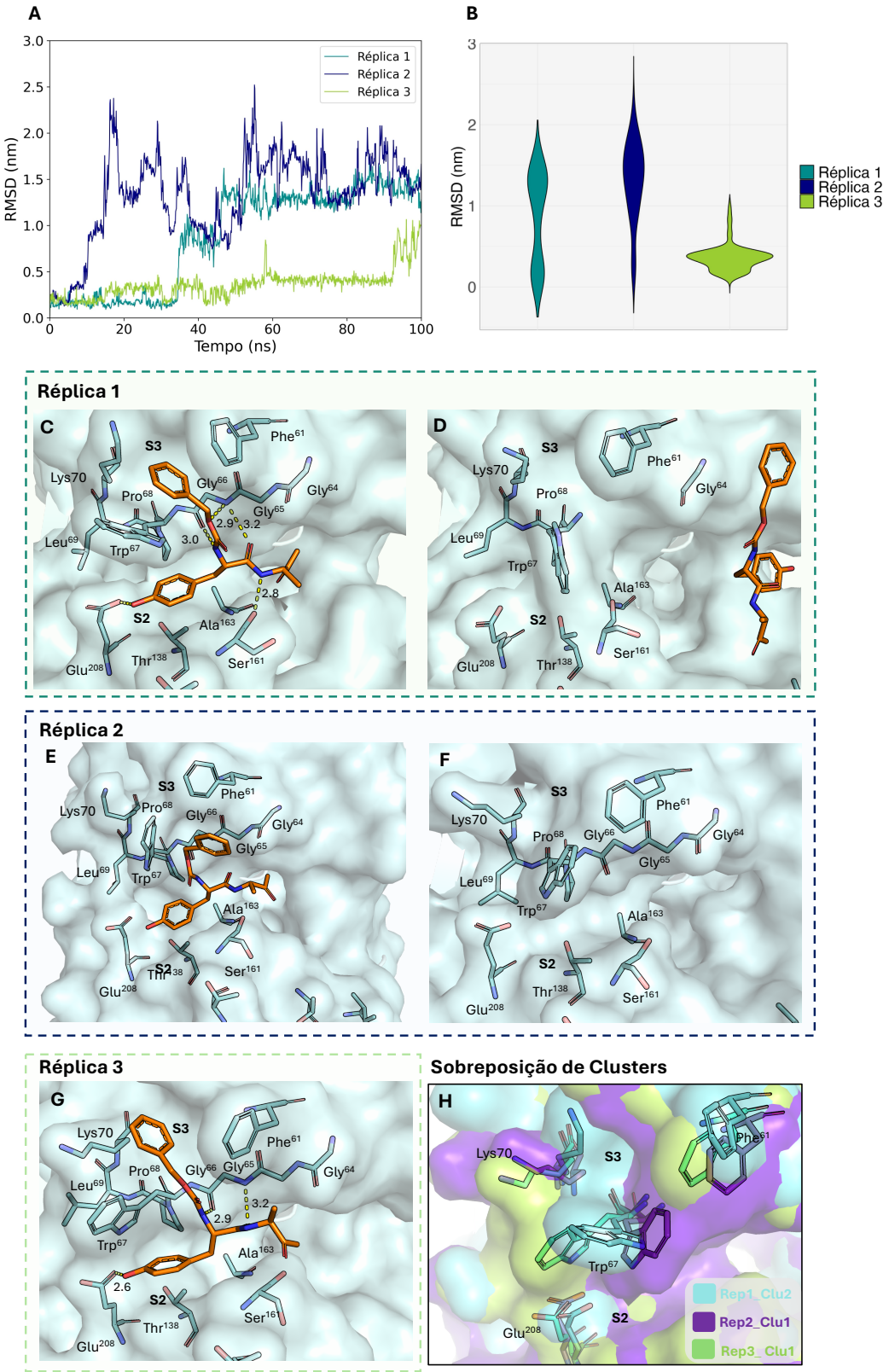


Figura 38 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 contra a czp3.7. A) Valores de RMSD para o ligante ao longo de 100 ns de simulação para 3 réplicas. B) Distribuição dos valores de RMSD ao longo da

simulação para as 3 réplicas. C) Cluster 2 (36 frames) e D) cluster 1 (50 frames) para a réplica 1. E) Cluster 2 (26 frames) e F) cluster 1 (27 frames) para a réplica 2. G) Cluster 1 (70 frames) para a réplica 3 da simulação de dinâmica molecular contra a czp3.7. H) Sobreposição do Réplica1_Cluster2 (azul claro), e Réplica3_Cluster1 (verde), nos quais o inibidor está no sítio ativo, e Réplica2_Cluster1 (roxo) em que o inibidor está fora do sítio. Interações polares representadas por linhas amarelas tracejadas.

Na réplica 2, o composto sai do sítio ativo aos 12 ns de simulação (Anexo 3). Ao analisar o vídeo, em conjunto com os clusters mais populosos, o impacto das orientações dos resíduos Phe61 e Trp67 na interação proteína-composto fica novamente evidente. Inicialmente (Anexo 3), os dois resíduos se aproximam, resultando em uma mudança na orientação do anel aromático que ocupa o subsítio S3. Essa alteração pode ser observada no segundo cluster mais populoso (**Figura 38E**), no qual é evidente a proximidade entre Phe61 e Trp67, além da orientação distinta do anel no S3. Na análise do cluster mais populoso (**Figura 38F**) a proximidade dos resíduos Phe61 e Trp67 é reforçada, resultando na oclusão do S3 e impedimento do posicionamento de grupos volumosos nesse subsítio.

Por outro lado, na réplica 3, o composto permanece no sítio ativo durante 96 ns da simulação. O resíduo Trp67 assume uma orientação voltada para fora dos subsítios S2 e S3 (Anexo 3 e **Figura 39G**). Essa orientação parece contribuir para a manutenção dos grupos posicionados nesses subsítios, bem como para a manutenção da ligação de hidrogênio com o Glu208.

Por fim, a sobreposição de clusters (**Figura 38H**) evidencia que a orientação de Phe61 e Trp67 na réplica 2 leva à oclusão do subsítio S3, impedindo o posicionamento de grupos volumosos. Já nas réplicas 1 e 3, orientações mais abertas desses resíduos permitem a ocupação do sítio ativo por um período maior ao longo da simulação.

4.5.3 Cruzipaína 3.9

As simulações para a czp3.9 mostram que a estabilidade do ligante varia entre as três réplicas, sendo influenciada principalmente pela orientação do resíduo Trp67. Na réplica 1, o composto sai do sítio ativo aos 18 ns da simulação e retorna assumindo uma pose distinta da inicial (Anexo 3, **Figura 39A**, **B**). De maneira semelhante ao observado para a réplica 1 da czp3.7, a orientação do resíduo Trp67 na czp3.9 é alterada, passando a ocupar o subsítio S2. Essa mudança desfavorece o posicionamento do grupo fenol no S2, uma vez que o impedimento estérico gerado impede sua acomodação neste subsítio, levando consequentemente à perda da ligação de hidrogênio com o Glu208. No cluster mais populoso (**Figura 39C**), essa orientação do Trp67, bem como a pose do composto após a saída do sítio. Nesse momento, o composto passa a realizar ligações de hidrogênio com resíduos como Trp67, Gly66 e Gln59. No entanto,

essa pose é desfavorável para a formação de uma ligação covalente com a Cys25, pois a carbonila da fluormetilcetona, que sofre o ataque nucleofílico, está posicionada na região do S2, onde interage com Trp67.

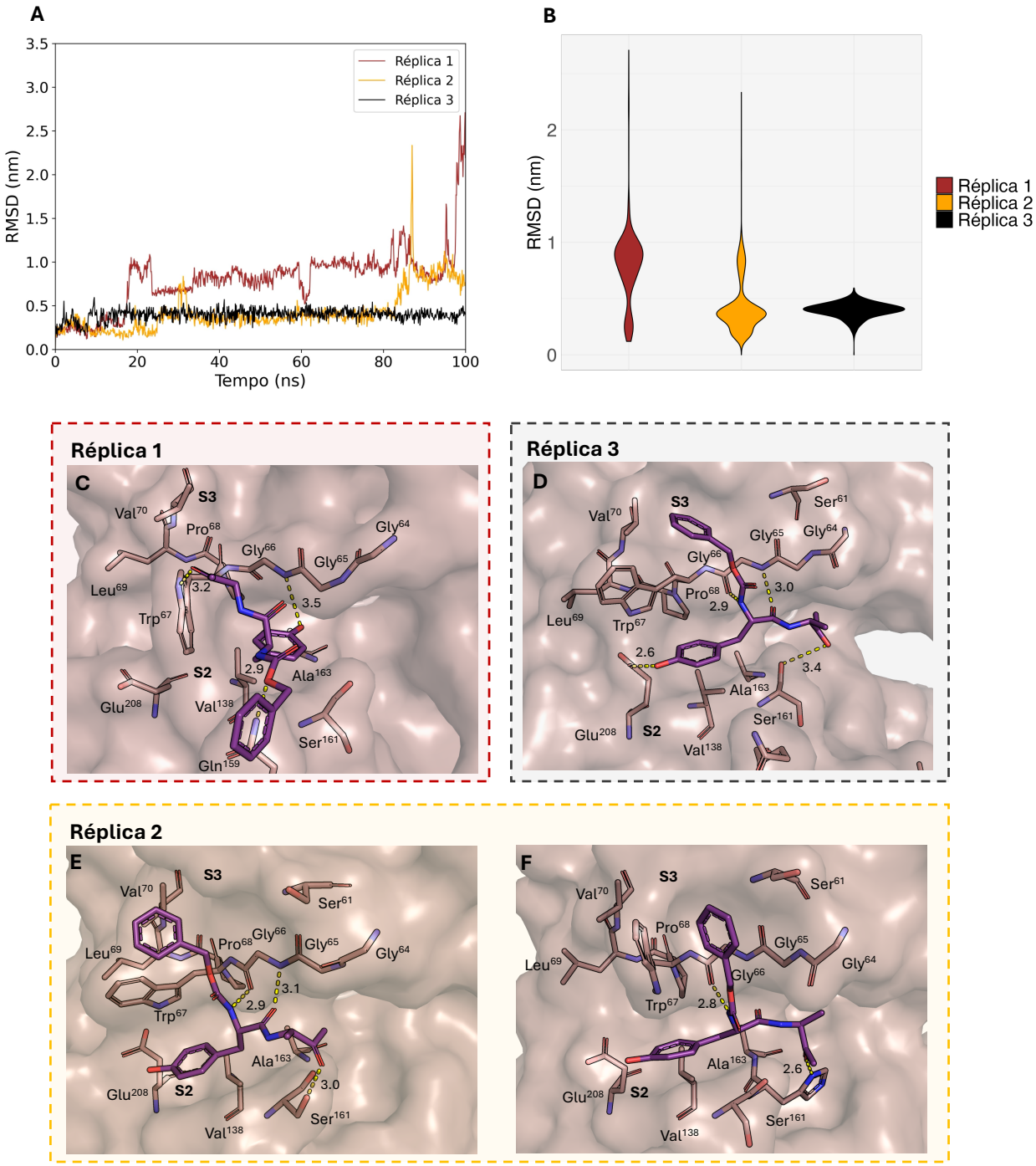


Figura 39 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 contra a czp3.9. A) Valores de RMSD para o ligante ao longo de 100 ns de simulação para 3 réplicas. B) Distribuição dos valores de RMSD ao longo da simulação para as 3 réplicas. C) Cluster 1 (108 frames) para a réplica 1. D) Cluster 1 para a réplica 3 (47 frames). E) Cluster 1 (47 frames) e F) cluster 2 (40 frames) para a réplica 2 da simulação de dinâmica molecular contra a czp3.9. Interações polares representadas por linhas amarelas tracejadas.

Na réplica 2, o composto permanece no sítio ativo durante 87 ns da simulação. Os clusters mais populosos (**Figura 39E** e **F**, respectivamente) indicam que Trp67 não assume a orientação observada na réplica 1, favorecendo a ocupação do S2. Além disso, a presença de Ser61 no lugar da Phe evita a oclusão do subsítio S3, mesmo quando Trp67 se orienta na direção desse subsítio. Por fim, o composto permanece no sítio ativo ao longo de toda a simulação na réplica 3. O resíduo Trp67 adota uma orientação voltada para fora do S2, permitindo o posicionamento dos anéis nos subsítios S2 e S3 (**Figura 39D**). Essa mesma orientação também foi amostrada na réplica 3 da czp3.7, onde o composto se manteve no sítio ativo ao longo da simulação.

4.5.4 Cruzipaína 4

A análise da dinâmica molecular para czp4 revelou que a estabilidade do composto no sítio ativo foi distinta para as três réplicas. Na réplica 1, o composto permaneceu no sítio ativo durante 65 ns da simulação (Anexo 3, **Figura 40A** e **B**), inicialmente mantendo a pose inicial por cerca de 25 ns. A análise do cluster mais populoso mostra que a substituição de Glu208 por Gly resultou na perda da ligação de hidrogênio com o grupo fenol no S2. No entanto, outras interações importantes foram preservadas, como as ligações de hidrogênio com Asp161 e Gly66, que se mantiveram durante grande parte da simulação (**Figura 40C**). Após os primeiros 25 ns, o composto sofre uma mudança de pose, com o nitrogênio da amida deixando de interagir com Ser161. Esta interação passa a ser feita entre o resíduo e a carbonila, como observado no terceiro cluster mais representativo (**Figura 40D**). Em torno de 65 ns, o composto sai do sítio ativo.

Na réplica 2, o composto apresenta baixa estabilidade (**Figura 40A**) Nesta réplica, o composto não estabelece interações com os resíduos Asp161 e Gly66. Além disso, o grupo fenol no S2 adota uma orientação em que a hidroxila interage com a cadeia principal da Gly66 durante o período de 9,9 ns e 14,6 ns da simulação (**Figura 40E**). No entanto, essa interação proteína-ligante não é favorável, resultando na perda de estabilidade do composto no sítio ativo.

Já na réplica 3, o composto permanece no sítio ativo por cerca de 40 ns, realizando ligações de hidrogênio com os resíduos Asp161 e Gly66 (**Figura 40F**). No entanto, após esse período, as ligações de hidrogênio são desfeitas e os grupos polares expostos ao solvente levam o composto a deixar o sítio ativo.

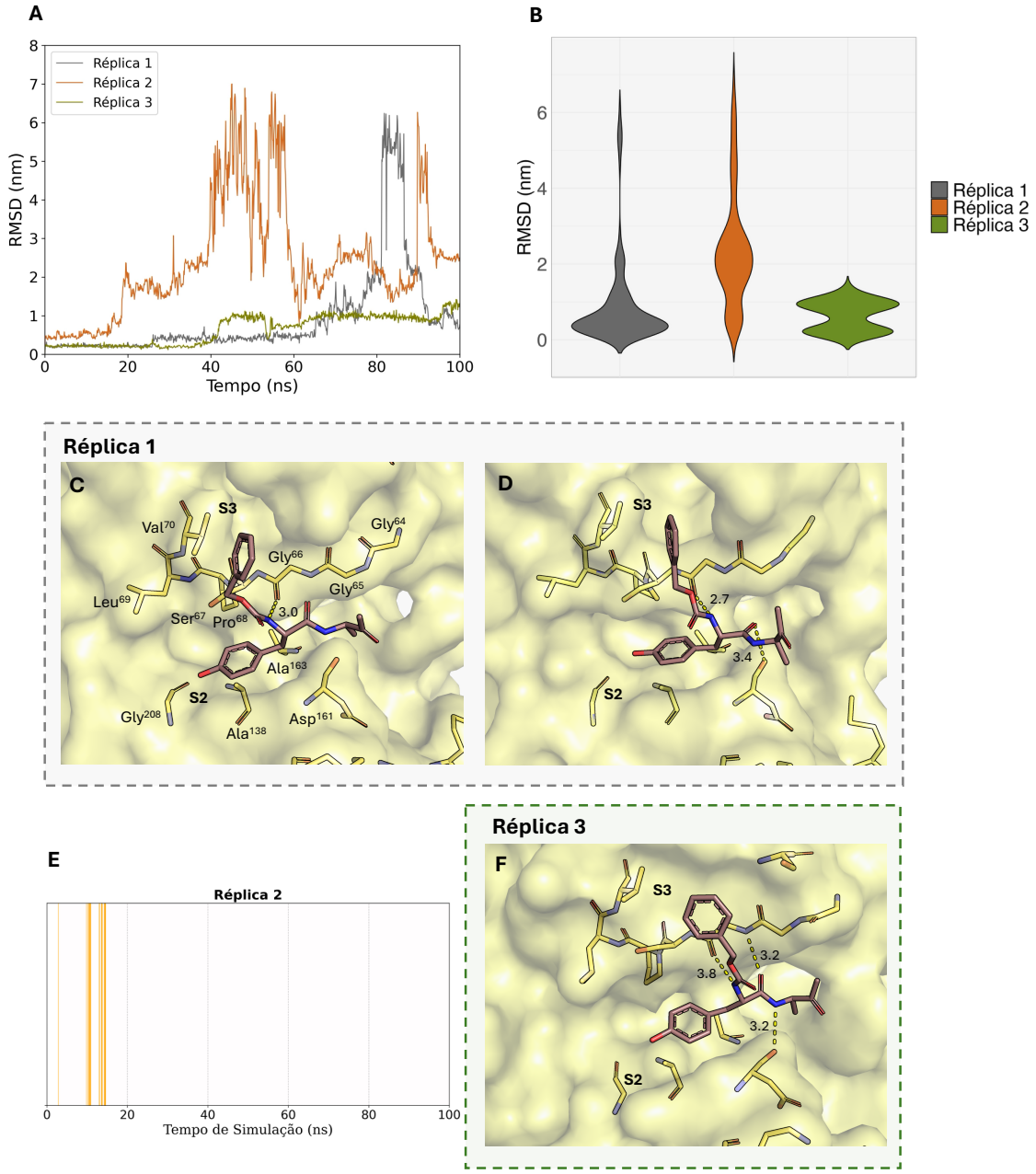


Figura 40 - Simulações de dinâmica molecular do ligante 16 contra a czp4. A) Valores de RMSD para o ligante ao longo de 100 ns de simulação para 3 réplicas. B) Distribuição dos valores de RMSD ao longo da simulação para as 3 réplicas. C) Cluster 1 (63 frames) e D) cluster 3 (35 frames) para a réplica 1. E) Frequência de ligações de hidrogênio com Gly208 ao longo da simulação para as 3 réplicas. F) Cluster 2 (27 frames) para a réplica 3. Interações polares representadas por linhas amarelas tracejadas.

Uma característica importante da czp4 é a presença dos resíduos Ser67 e Ser61. Isso pode facilitar a interação do composto com o sítio ativo, uma vez que não há impedimentos estéricos para o posicionamento dos anéis nos subsítios S2 e S3. Além disso, a substituição de Glu208 por Gly208 pode ter influenciado na estabilidade da interação cruzipaína-inibidor Enquanto o Glu208 interage com a hidroxila do fenol nas outras cruzipaínas, na czp4, a ausência dessa interação pode ter favorecido a saída do composto do sítio ativo. A presença de grupos carbonila e hidroxila voltados para o solvente pode ter contribuído para essa mudança. Em

contraste, na czp2, apesar desses mesmos grupos carbonila estarem voltados para o solvente, a interação do Glu208 com o fenol favorece a estabilização do complexo proteína-inibidor.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, desenvolvemos e aplicamos um protocolo de *docking* molecular para investigar o impacto de substituições na interação com inibidores da cruzaína. As análises demonstraram que o protocolo consegue distinguir entre compostos ativos e decoys (AUC da curva ROC = 0,83), atribuindo melhor ranqueamento aos ativos. No entanto, o baixo grau de enriquecimento sugere a necessidade de refinamentos para sua aplicação em triagens virtuais.

Adicionalmente, as análises de *redocking* indicaram uma taxa de sucesso de 52,17%, evidenciando a capacidade do protocolo de reproduzir o modo de ligação experimental dos inibidores. Esses resultados sugerem que, embora sejam necessárias otimizações para sua aplicação em triagens virtuais, o protocolo pode ser empregado na investigação das interações entre as cruzipaínas e inibidores.

As análises de *docking* e *rescoring* indicaram que as substituições afetam as interações com os inibidores. Os resultados mostraram que substituições nos subsítios S2 e S3 tiveram maior impacto nas poses obtidas, com resíduos volumosos, como Phe61, obstruindo parcialmente essas regiões e influenciando o posicionamento dos ligantes. Além disso, apesar das limitações associadas, as análises de *rescoring* sugerem que as substituições alteram o perfil de interação com os inibidores, resultando em diferenças nos valores de energia estimada entre os subtipos.

As simulações de dinâmica molecular clássica proporcionaram uma compreensão mais aprofundada do impacto das substituições na estabilidade do complexo cruzipaína-inibidor. Dentre os subtipos, a cruzipaína 2 apresentou alta estabilidade, com o ligante **16** permanecendo no sítio ativo ao longo dos 100 ns de simulação. Para a cruzipaína 3.7, observou-se que a presença de Phe61 e Trp67 resultou em baixa estabilidade, com esses resíduos desfavorecendo o posicionamento do ligante nos subsítios S2 e S3. Na cruzipaína 3.9, em que apenas Trp67 está presente, o impacto sobre a estabilidade foi menos acentuado, com um efeito mais pronunciado na interação com o S2. Por fim, observou-se que a substituição de Glu208 por Gly resultou na perda da ligação de hidrogênio com o resíduo nesta posição, o que pode ter contribuído para a baixa estabilidade observada nas simulações. De forma geral, esses resultados reforçam a hipótese de que as substituições impactam as interações com os inibidores, possivelmente afetando também a afinidade de ligação.

É importante destacar algumas limitações deste estudo. O protocolo de *docking* empregado manteve a proteína rígida, permitindo flexibilidade apenas para o ligante. Dessa

forma, a orientação de resíduos como Phe61 no modelo pode ter influenciado os resultados. O uso de outros modelos, com diferentes conformações de resíduos, poderia complementar as conclusões iniciais e refinar as conclusões. Além disso, as simulações de dinâmica molecular foram realizadas com um inibidor covalente do tipo fluormetilcetona, assumindo um modo de ligação específico extraído do molde durante a modelagem comparativa. Embora tenha sido possível avaliar a estabilidade do pré-complexo, não foi possível determinar se as diferenças comprometeriam a formação da ligação covalente com a cruzipaína, uma vez que o comportamento eletrônico não foi considerado. Para isso, serão necessárias abordagens mais robustas, como simulações de QM/MM.

Embora nossos achados forneçam uma base para a compreensão do impacto das substituições, estudos experimentais são necessários para validar essas observações. A caracterização estrutural dos subtipos de cruzipaínas e a investigação do perfil de inibição de compostos conhecidos podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas séries de inibidores, impulsionando o aprimoramento de estratégias terapêuticas direcionadas às cruzipaínas.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, M. J.; MURTOLA, T.; SCHULZ, R.; PÁLL, S.; SMITH, J. C.; HESS, B.; LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, [*s. l.*], v. 1–2, p. 19–25, set. 2015. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001.

ALLEN, W. J.; BALIUS, T. E.; MUKHERJEE, S.; BROZELL, S. R.; MOUSTAKAS, D. T.; LANG, P. T.; CASE, D. A.; KUNTZ, I. D.; RIZZO, R. C. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance. **Journal of Computational Chemistry**, [*s. l.*], v. 36, n. 15, p. 1132–1156, 5 jun. 2015. https://doi.org/10.1002/jcc.23905.

ANDRADE, M. M.; MARTINS, L. C.; MARQUES, G. V.; SILVA, C. A.; FARIA, G.; CALDAS, S.; DOS SANTOS, J. S.; LECLERCQ, S. Y.; MALTAROLLO, V. G.; FERREIRA, R. S.; OLIVEIRA, R. B. Synthesis of Quinoline Derivatives as Potential Cysteine Protease Inhibitors. **Future Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 12, n. 7, p. 571–581, abr. 2020. https://doi.org/10.4155/fmc-2019-0201.

APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A. A New Cruzipain-Mediated Pathway of Human Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Requires Trypomastigote Membranes. **Infection and Immunity**, [*s. l.*], v. 72, n. 10, p. 5892–5902, out. 2004. https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5892-5902.2004.

ARAFET, K.; FERRER, S.; MOLINER, V. Computational Study of the Catalytic Mechanism of the Cruzain Cysteine Protease. **ACS Catalysis**, [*s. l.*], v. 7, n. 2, p. 1207–1215, 3 fev. 2017. https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03096.

ARAFET, K.; ŚWIDEREK, K.; MOLINER, V. Computational Study of the Michaelis Complex Formation and the Effect on the Reaction Mechanism of Cruzain Cysteine Protease. **ACS Omega**, [*s. l.*], v. 3, n. 12, p. 18613–18622, 31 dez. 2018. https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03010.

ASHALL, F.; ANGLIKER, H.; SHAW, E. Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [*s. l.*], v. 170, n. 2, p. 923–929, jul. 1990. https://doi.org/10.1016/0006-291X(90)92179-4.

AVELAR, L. A. A.; CAMILO, C. D.; DE ALBUQUERQUE, S.; FERNANDES, W. B.; GONÇALEZ, C.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A.; OROZCO, E. V. M.; RIBEIRO, J. F. R.; ROCHA, J. R.; ROSINI, F.; SAIDEL, M. E. Molecular Design, Synthesis and Trypanocidal Activity of Dipeptidyl Nitriles as Cruzain Inhibitors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [*s. l.*], v. 9, n. 7, p. e0003916, 14 jul. 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003916.

BANDYOPADHYAY, A.; GAO, J. Targeting biomolecules with reversible covalent chemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, [*s. l.*], v. 34, p. 110–116, out. 2016. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.08.011.

BARBOSA DA SILVA, E.; ROCHA, D. A.; FORTES, I. S.; YANG, W.; MONTI, L.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; CAFFREY, C. R.; MCKERROW, J.; ANDRADE, S. F.; FERREIRA, R. S. Structure-Based Optimization of Quinazolines as Cruzain and *Tbr* CATL Inhibitors.

Journal of Medicinal Chemistry, [*s. l.*], v. 64, n. 17, p. 13054–13071, 9 set. 2021. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01151.

BARBOSA DA SILVA, E.; SHARMA, V.; HERNANDEZ-ALVAREZ, L.; TANG, A. H.; STOYE, A.; O'DONOGHUE, A. J.; GERWICK, W. H.; PAYNE, R. J.; MCKERROW, J. H.; PODUST, L. M. Intramolecular Interactions Enhance the Potency of Gallinamide A Analogues against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 65, n. 5, p. 4255–4269, 10 mar. 2022. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c02063.

BEAULIEU, C.; ISABEL, E.; FORTIER, A.; MASSÉ, F.; MELLON, C.; MÉTHOT, N.; NDAO, M.; NICOLL-GRIFFITH, D.; LEE, D.; PARK, H.; BLACK, W. C. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [*s. l.*], v. 20, n. 24, p. 7444–7449, dez. 2010. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.10.015.

BENDER, B. J.; GAHBAUER, S.; LUTTENS, A.; LYU, J.; WEBB, C. M.; STEIN, R. M.; FINK, E. A.; BALIUS, T. E.; CARLSSON, J.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. A practical guide to large-scale docking. **Nature Protocols**, [*s. l.*], v. 16, n. 10, p. 4799–4832, out. 2021. https://doi.org/10.1038/s41596-021-00597-z.

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, [*s. l.*], v. 27, n. 3, p. 343–350, 1 fev. 2011. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662.

BERASAIN, P.; CARMONA, C.; FRANGIONE, B.; CAZZULO, J. J.; GOÑI, F. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 130, n. 1, p. 23–29, ago. 2003. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00139-7.

BRAGA, S. F. P.; MARTINS, L. C.; DA SILVA, E. B.; SALES JÚNIOR, P. A.; MURTA, S. M. F.; ROMANHA, A. J.; SOH, W. T.; BRANDSTETTER, H.; FERREIRA, R. S.; DE OLIVEIRA, R. B. Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 25, n. 6, p. 1889–1900, mar. 2017. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.009.

BRAK, K.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ELLMAN, J. A. Identification of a New Class of Nonpeptidic Inhibitors of Cruzain. **Journal of the American Chemical Society**, [*s. l.*], v. 130, n. 20, p. 6404–6410, 1 maio 2008. https://doi.org/10.1021/ja710254m.

BRAK, K.; KERR, I. D.; BARRETT, K. T.; FUCHI, N.; DEBNATH, M.; ANG, K.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; DOYLE, P. S.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Nonpeptidic Tetrafluorophenoxymethyl Ketone Cruzain Inhibitors as Promising New Leads for Chagas Disease Chemotherapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 53, n. 4, p. 1763–1773, 25 fev. 2010. https://doi.org/10.1021/jm901633v.

BRANCHE, C.; OCHAYA, S.; ÅSLUND, L.; ANDERSSON, B. Comparative karyotyping as a tool for genome structure analysis of Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 147, n. 1, p. 30–38, maio 2006. https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.01.005.

BRINEN, L. S.; HANSELL, E.; CHENG, J.; ROUSH, W. R.; MCKERROW, J. H.; FLETTERICK, R. J. A target within the target: probing cruzain's P1′ site to define structural determinants for the Chagas' disease protease. **Structure**, [*s. l.*], v. 8, n. 8, p. 831–840, ago. 2000. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00173-8.

BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, [*s. l.*], v. 32, n. 1, p. 335–373, jun. 2003. https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532.

BROZELL, S. R.; MUKHERJEE, S.; BALIUS, T. E.; ROE, D. R.; CASE, D. A.; RIZZO, R. C. Evaluation of DOCK 6 as a pose generation and database enrichment tool. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, [*s. l.*], v. 26, n. 6, p. 749–773, jun. 2012. https://doi.org/10.1007/s10822-012-9565-y.

BRYANT, C.; KERR, I. D.; DEBNATH, M.; ANG, K. K. H.; RATNAM, J.; FERREIRA, R. S.; JAISHANKAR, P.; ZHAO, D.; ARKIN, M. R.; MCKERROW, J. H.; BRINEN, L. S.; RENSLO, A. R. Novel non-peptidic vinylsulfones targeting the S2 and S3 subsites of parasite cysteine proteases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [*s. l.*], v. 19, n. 21, p. 6218–6221, nov. 2009. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.098.

BURLEIGH, B. A.; WOOLSEY, A. M. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. **Cellular Microbiology**, [*s. l.*], v. 4, n. 11, p. 701–711, nov. 2002. https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00226.x.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [*s. l.*], v. 94, n. suppl 1, p. 331–335, set. 1999. https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700064.

CASTRO-ALVAREZ, A.; COSTA, A.; VILARRASA, J. The Performance of Several Docking Programs at Reproducing Protein–Macrolide-Like Crystal Structures. **Molecules**, [*s. l.*], v. 22, n. 1, p. 136, 17 jan. 2017. https://doi.org/10.3390/molecules22010136.

CAZZULO, J. J.; COUSO, R.; RAIMONDI, A.; WERNSTEDT, C.; HELLMAN, U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 33, n. 1, p. 33–41, fev. 1989. https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90039-X.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **About Chagas Disease**. [*S. l.*: *s. n.*], 2024. Disponível em: https://www.cdc.gov/chagas/about/index.html.

CERETO-MASSAGUÉ, A.; OJEDA, M. J.; VALLS, C.; MULERO, M.; GARCIA-VALLVÉ, S.; PUJADAS, G. Molecular fingerprint similarity search in virtual screening. **Methods**, [*s. l.*], v. 71, p. 58–63, jan. 2015. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.08.005.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [*s. l.*], v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909. https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008.

CHANG, Y.; HAWKINS, B. A.; DU, J. J.; GROUNDWATER, P. W.; HIBBS, D. E.; LAI, F. A Guide to In Silico Drug Design. **Pharmaceutics**, [*s. l.*], v. 15, n. 1, p. 49, 23 dez. 2022. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010049.

CHEN, V. B.; ARENDALL, W. B.; HEADD, J. J.; KEEDY, D. A.; IMMORMINO, R. M.; KAPRAL, G. J.; MURRAY, L. W.; RICHARDSON, J. S.; RICHARDSON, D. C. *MolProbity* : all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, [*s. l.*], v. 66, n. 1, p. 12–21, 1 jan. 2010. https://doi.org/10.1107/S0907444909042073.

CHEN, Y. T.; BRINEN, L. S.; KERR, I. D.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; MCKERROW, J. H.; ROUSH, W. R. In Vitro and In Vivo Studies of the Trypanocidal Properties of WRR-483 against Trypanosoma cruzi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [*s. l.*], v. 4, n. 9, p. e825, 14 set. 2010. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000825.

CHOE, Y.; BRINEN, L. S.; PRICE, M. S.; ENGEL, J. C.; LANGE, M.; GRISOSTOMI, C.; WESTON, S. G.; PALLAI, P. V.; CHENG, H.; HARDY, L. W.; HARTSOUGH, D. S.; MCMAKIN, M.; TILTON, R. F.; BALDINO, C. M.; CRAIK, C. S. Development of α-keto-based inhibitors of cruzain, a cysteine protease implicated in Chagas disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 13, n. 6, p. 2141–2156, mar. 2005. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.12.053.

CHOE, Y.; LEONETTI, F.; GREENBAUM, D. C.; LECAILLE, F.; BOGYO, M.; BRÖMME, D.; ELLMAN, J. A.; CRAIK, C. S. Substrate Profiling of Cysteine Proteases Using a Combinatorial Peptide Library Identifies Functionally Unique Specificities. **Journal of Biological Chemistry**, [*s. l.*], v. 281, n. 18, p. 12824–12832, maio 2006. https://doi.org/10.1074/jbc.M513331200.

CHOY, J. W.; BRYANT, C.; CALVET, C. M.; DOYLE, P. S.; GUNATILLEKE, S. S.; LEUNG, S. S. F.; ANG, K. K. H.; CHEN, S.; GUT, J.; OSES-PRIETO, J. A.; JOHNSTON, J. B.; ARKIN, M. R.; BURLINGAME, A. L.; TAUNTON, J.; JACOBSON, M. P.; MCKERROW, J. M.; PODUST, L. M.; RENSLO, A. R. Chemical–biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, [*s. l.*], v. 9, p. 15–25, 4 jan. 2013. https://doi.org/10.3762/bjoc.9.3.

CIANNI, L.; SARTORI, G.; ROSINI, F.; DE VITA, D.; PIRES, G.; LOPES, B. R.; LEITÃO, A.; BURTOLOSO, A. C. B.; MONTANARI, C. A. Leveraging the cruzain S3 subsite to increase affinity for reversible covalent inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, [*s. l.*], v. 79, p. 285–292, set. 2018. https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.04.006.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: Patterns of nonbonded atomic interactions. **Protein Science**, [*s. l.*], v. 2, n. 9, p. 1511–1519, set. 1993. https://doi.org/10.1002/pro.5560020916.

DASSAULT SYSTÈMES. **Discovery Studio**. [*S. l.*: *s. n.*], 2020.

DE A. LIMA, A. P. C.; TESSIER, D. C.; THOMAS, D. Y.; SCHARFSTEIN, J.; STORER, A. C.; VERNET, T. Identification of new cysteine protease gene isoforms in Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 67, n. 2, p. 333–338, out. 1994. https://doi.org/10.1016/0166-6851(94)00144-8.

DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; CARDOSO, M. V. D. O.; ESPÍNDOLA, J. W. P.; OLIVEIRA E SILVA, D. A.; FERREIRA, R. S.; COELHO, P. L.; ANJOS, P. S. D.; SANTOS, E. D. S.; MEIRA, C. S.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P.; LEITE, A. C. L. Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against Trypanosoma cruzi. **European**

Journal of Medicinal Chemistry, [*s. l.*], v. 141, p. 346–361, dez. 2017. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.09.047.

DE SOUSA, A. S.; VERMEIJ, D.; RAMOS, A. N.; LUQUETTI, A. O. Chagas disease. **The Lancet**, [*s. l.*], v. 403, n. 10422, p. 203–218, jan. 2024. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01787-7.

DE SOUZA, M. L.; DE OLIVEIRA REZENDE JUNIOR, C.; FERREIRA, R. S.; ESPINOZA CHÁVEZ, R. M.; FERREIRA, L. L. G.; SLAFER, B. W.; MAGALHÃES, L. G.; KROGH, R.; OLIVA, G.; CRUZ, F. C.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Discovery of Potent, Reversible, and Competitive Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity: A Structure-Based Drug Design Approach. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [*s. l.*], v. 60, n. 2, p. 1028–1041, 24 fev. 2020. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00802.

DEL NERY, E.; JULIANO, M. A.; MELDAL, M.; SVENDSEN, I.; SCHARFSTEIN, J.; WALMSLEY, A.; JULIANO, L. Characterization of the substrate specificity of the major cysteine protease (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* using a portion-mixing combinatorial library and fluorogenic peptides. **Biochemical Journal**, [*s. l.*], v. 323, n. 2, p. 427–433, 15 abr. 1997. https://doi.org/10.1042/bj3230427.

DIAO, L.; MEIBOHM, B. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Correlations of Therapeutic Peptides. **Clinical Pharmacokinetics**, [*s. l.*], v. 52, n. 10, p. 855–868, out. 2013. https://doi.org/10.1007/s40262-013-0079-0.

DO VALLE MOREIRA, T.; MARTINS, L. C.; DINIZ, L. A.; BERNARDES, T. C. D.; DE OLIVEIRA, R. B.; FERREIRA, R. S. Screening the Pathogen Box to Discover and Characterize New Cruzain and TbrCatL Inhibitors. **Pathogens**, [*s. l.*], v. 12, n. 2, p. 251, 4 fev. 2023. https://doi.org/10.3390/pathogens12020251.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J.; STOPPANI, A. O. M. Nitrofuran enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [*s. l.*], v. 207, n. 2, p. 316–324, abr. 1981. https://doi.org/10.1016/0003-9861(81)90039-4.

DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H. A Cysteine Protease Inhibitor Cures Chagas' Disease in an Immunodeficient-Mouse Model of Infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [*s. l.*], v. 51, n. 11, p. 3932–3939, nov. 2007. https://doi.org/10.1128/AAC.00436-07.

DOYLE, P. S.; ZHOU, Y. M.; HSIEH, I.; GREENBAUM, D. C.; MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C. The Trypanosoma cruzi Protease Cruzain Mediates Immune Evasion. **PLoS Pathogens**, [*s. l.*], v. 7, n. 9, p. e1002139, 1 set. 2011. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002139.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and Structure−Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 45, n. 13, p. 2695–2707, 1 jun. 2002. https://doi.org/10.1021/jm010459j.

DU, X.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry & Biology**, [*s. l.*], v. 7, n. 9, p. 733–742, set. 2000. https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00018-1.

DUSCHAK, V. G. Major Kinds of Drug Targets in Chagas Disease or American Trypanosomiasis. **Current Drug Targets**, [*s. l.*], v. 20, n. 11, p. 1203–1216, 22 ago. 2019. https://doi.org/10.2174/1389450120666190423160804.

EAKIN, A. E.; MCGRATH, M. E.; MCKERROW, J. H.; FLETTERICK, R. J.; CRAIK, C. S. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from Trypanosoma cruzi. **The Journal of Biological Chemistry**, [*s. l.*], v. 268, n. 9, p. 6115–6118, 25 mar. 1993. .

EAKIN, A. E.; MILLS, A. A.; HARTH, G.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from Trypanosoma cruzi. **The Journal of Biological Chemistry**, [*s. l.*], v. 267, n. 11, p. 7411–7420, 15 abr. 1992. .

ECHEVERRÍA, L. E.; MARCUS, R.; NOVICK, G.; SOSA-ESTANI, S.; RALSTON, K.; ZAIDEL, E. J.; FORSYTH, C.; RIBEIRO, A. L. P.; MENDOZA, I.; FALCONI, M. L.; MITELMAN, J.; MORILLO, C. A.; PEREIRO, A. C.; PINAZO, M. J.; SALVATELLA, R.; MARTINEZ, F.; PEREL, P.; LIPRANDI, Á. S.; PIÑEIRO, D. J.; MOLINA, G. R. WHF IASC Roadmap on Chagas Disease. **Global Heart**, [*s. l.*], v. 15, n. 1, p. 26, 30 mar. 2020. https://doi.org/10.5334/gh.484.

ECHEVERRIA, L. E.; MORILLO, C. A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, [*s. l.*], v. 33, n. 1, p. 119–134, mar. 2019. https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine Protease Inhibitors Cure an Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **The Journal of Experimental Medicine**, [*s. l.*], v. 188, n. 4, p. 725–734, 17 ago. 1998. https://doi.org/10.1084/jem.188.4.725.

FABBRO, D. L.; STREIGER, M. L.; ARIAS, E. D.; BIZAI, M. L.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N. A. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [*s. l.*], v. 40, n. 1, p. 1–10, fev. 2007. https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000100001.

FERRÃO, P. M.; D'AVILA-LEVY, C. M.; ARAUJO-JORGE, T. C.; DEGRAVE, W. M.; GONÇALVES, A. D. S.; GARZONI, L. R.; LIMA, A. P.; FEIGE, J. J.; BAILLY, S.; MENDONÇA-LIMA, L.; WAGHABI, M. C. Cruzipain Activates Latent TGF-β from Host Cells during T. cruzi Invasion. **PLOS ONE**, [*s. l.*], v. 10, n. 5, p. e0124832, 4 maio 2015. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124832.

FERREIRA, L.; DOS SANTOS, R.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, [*s. l.*], v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015. https://doi.org/10.3390/molecules200713384.

FERREIRA, R. A. A.; PAULI, I.; SAMPAIO, T. S.; DE SOUZA, M. L.; FERREIRA, L. L. G.; MAGALHÃES, L. G.; REZENDE, C. D. O.; FERREIRA, R. S.; KROGH, R.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-Based and Molecular Modeling Studies for the Discovery of Cyclic Imides as Reversible Cruzain Inhibitors With Potent Anti-Trypanosoma cruzi

Activity. **Frontiers in Chemistry**, [*s. l.*], v. 7, p. 798, 25 nov. 2019. https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00798.

FERREIRA, R. S.; DESSOY, M. A.; PAULI, I.; SOUZA, M. L.; KROGH, R.; SALES, A. I. L.; OLIVA, G.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–Activity Relationships of Potent Noncovalent and Nonpeptidic Cruzain Inhibitors as Anti- *Trypanosoma cruzi* Agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 57, n. 6, p. 2380–2392, 27 mar. 2014. https://doi.org/10.1021/jm401709b.

FERREIRA, R. S.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A.; EIDAM, O.; MOTT, B. T.; KEISER, M. J.; MCKERROW, J. H.; MALONEY, D. J.; IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. Complementarity Between a Docking and a High-Throughput Screen in Discovering New Cruzain Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 53, n. 13, p. 4891–4905, 8 jul. 2010. https://doi.org/10.1021/jm100488w.

FONSECA, N. C.; DA CRUZ, L. F.; DA SILVA VILLELA, F.; DO NASCIMENTO PEREIRA, G. A.; DE SIQUEIRA-NETO, J. L.; KELLAR, D.; SUZUKI, B. M.; RAY, D.; DE SOUZA, T. B.; ALVES, R. J.; JÚNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; MURTA, S. M. F.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R.; DE OLIVEIRA, R. B.; FERREIRA, R. S. Synthesis of a Sugar-Based Thiosemicarbazone Series and Structure-Activity Relationship versus the Parasite Cysteine Proteases Rhodesain, Cruzain, and Schistosoma mansoni Cathepsin B1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [*s. l.*], v. 59, n. 5, p. 2666–2677, maio 2015. https://doi.org/10.1128/AAC.04601-14.

FRANKE DE CAZZULO, B. M.; MARTÃ-NEZ, J.; NORTH, M. J.; COOMBS, G. H.; CAZZULO, J.-J. Effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiology Letters**, [*s. l.*], v. 124, n. 1, p. 81–86, nov. 1994. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07265.x.

GAUNT, M. W.; YEO, M.; FRAME, I. A.; STOTHARD, J. R.; CARRASCO, H. J.; TAYLOR, M. C.; MENA, S. S.; VEAZEY, P.; MILES, G. A. J.; ACOSTA, N.; DE ARIAS, A. R.; MILES, M. A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, [*s. l.*], v. 421, n. 6926, p. 936–939, fev. 2003. https://doi.org/10.1038/nature01438.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein Science**, [*s. l.*], v. 6, n. 8, p. 1603–1611, ago. 1997. https://doi.org/10.1002/pro.5560060801.

GOMES, J. C.; CIANNI, L.; RIBEIRO, J.; DOS REIS ROCHO, F.; DA COSTA MARTINS SILVA, S.; BATISTA, P. H. J.; MORAES, C. B.; FRANCO, C. H.; FREITAS-JUNIOR, L. H. G.; KENNY, P. W.; LEITÃO, A.; BURTOLOSO, A. C. B.; DE VITA, D.; MONTANARI, C. A. Synthesis and structure-activity relationship of nitrile-based cruzain inhibitors incorporating a trifluoroethylamine-based P2 amide replacement. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 27, n. 22, p. 115083, nov. 2019. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115083.

GONZÁLEZ, F. V.; IZQUIERDO, J.; RODRI´GUEZ, S.; MCKERROW, J. H.; HANSELL, E. Dipeptidyl-α,β-epoxyesters as potent irreversible inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [*s. l.*], v. 17, n. 24, p. 6697–6700, dez. 2007. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.056.

GREG LANDRUM; PAOLO TOSCO; BRIAN KELLEY; RICARDO RODRIGUEZ; DAVID COSGROVE; RICCARDO VIANELLO; SRINIKER; PETER GEDECK; GARETH JONES; NADINESCHNEIDER; EISUKE KAWASHIMA; DAN NEALSCHNEIDER; ANDREW DALKE; MATT SWAIN; BRIAN COLE; SAMO TURK; ALEKSANDR SAVELEV; TADHURST-CDD; ALAIN VAUCHER; MACIEJ WÓJCIKOWSKI; ICHIRU TAKE; VINCENT F. SCALFANI; RACHEL WALKER; KAZUYA UJIHARA; DANIEL PROBST; JUUSO LEHTIVARJO; HUSSEIN FAARA; GUILLAUME GODIN; AXEL PAHL; JEREMY MONAT. **rdkit/rdkit: 2024_09_6 (Q3 2024) Release**. [*S. l.*]: Zenodo, 28 fev. 2025. DOI 10.5281/ZENODO.591637. Disponível em: https://zenodo.org/doi/10.5281/zenodo.591637. Acesso em: 19 mar. 2025.

GUEDES, I. A.; DE MAGALHÃES, C. S.; DARDENNE, L. E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical Reviews**, [*s. l.*], v. 6, n. 1, p. 75–87, mar. 2014. https://doi.org/10.1007/s12551-013-0130-2.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Poverty, Migration, and Chagas Disease. **Current Tropical Medicine Reports**, [*s. l.*], v. 8, n. 1, p. 52–58, mar. 2021. https://doi.org/10.1007/s40475-020-00225-y.

GUHL, F.; RAMÍREZ, J. D. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. **Infection, Genetics and Evolution**, [*s. l.*], v. 20, p. 148–154, dez. 2013. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.028.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [*s. l.*], v. 56, n. 1, p. 115–123, jan. 2012. https://doi.org/10.1128/AAC.05135-11.

HARTH, G.; ANDREWS, N.; MILLS, A. A.; ENGEL, J. C.; SMITH, R.; MCKERROW, J. H. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of Trypanosoma cruzi. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 58, n. 1, p. 17–24, mar. 1993. https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90086-D.

HEFTI, F. F. Requirements for a lead compound to become a clinical candidate. **BMC Neuroscience**, [*s. l.*], v. 9, n. S3, p. S7, dez. 2008. https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-S3-S7.

HUANG, J.; RAUSCHER, S.; NAWROCKI, G.; RAN, T.; FEIG, M.; DE GROOT, B. L.; GRUBMÜLLER, H.; MACKERELL, A. D. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods**, [*s. l.*], v. 14, n. 1, p. 71–73, jan. 2017. https://doi.org/10.1038/nmeth.4067.

HUANG, L.; BRINEN, L. S.; ELLMAN, J. A. Crystal structures of reversible ketone-Based inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 11, n. 1, p. 21–29, jan. 2003. https://doi.org/10.1016/S0968-0896(02)00427-3.

JAKALIAN, A.; JACK, D. B.; BAYLY, C. I. Fast, efficient generation of high-quality atomic charges. AM1-BCC model: II. Parameterization and validation. **Journal of Computational Chemistry**, [*s. l.*], v. 23, n. 16, p. 1623–1641, dez. 2002. https://doi.org/10.1002/jcc.10128.

JASINSKI, G.; MARTINI, M. F.; MOGLIONI, A. Thirty Years in the Design and Development of Cruzain Inhibitors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [*s. l.*], 2024. DOI 10.21577/0103-5053.20240115. Disponível em:

https://jbcs.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=12746&nomeArquivo=2024-0025RV_MedChem.pdf. Acesso em: 19 mar. 2025.

JO, S.; KIM, T.; IYER, V. G.; IM, W. CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, [*s. l.*], v. 29, n. 11, p. 1859–1865, ago. 2008. https://doi.org/10.1002/jcc.20945.

JONES, B. D.; TOCHOWICZ, A.; TANG, Y.; CAMERON, M. D.; MCCALL, L.-I.; HIRATA, K.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; REED, S. L.; MCKERROW, J. H.; ROUSH, W. R. Synthesis and Evaluation of Oxyguanidine Analogues of the Cysteine Protease Inhibitor WRR-483 against Cruzain. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 77–82, 14 jan. 2016. https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00336.

JUDICE, W. A. S.; CEZARI, M. H. S.; LIMA, A. P. C. A.; SCHARFSTEIN, J.; CHAGAS, J. R.; TERSARIOL, I. L. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. Comparison of the specificity, stability and individual rate constants with respective activation parameters for the peptidase activity of cruzipain and its recombinant form, cruzain, from *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Biochemistry**, [*s. l.*], v. 268, n. 24, p. 6578–6586, 15 dez. 2001. https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02612.x.

JURRUS, E.; ENGEL, D.; STAR, K.; MONSON, K.; BRANDI, J.; FELBERG, L. E.; BROOKES, D. H.; WILSON, L.; CHEN, J.; LILES, K.; CHUN, M.; LI, P.; GOHARA, D. W.; DOLINSKY, T.; KONECNY, R.; KOES, D. R.; NIELSEN, J. E.; HEAD-GORDON, T.; GENG, W.; KRASNY, R.; WEI, G.; HOLST, M. J.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. **Protein Science**, [*s. l.*], v. 27, n. 1, p. 112–128, jan. 2018. https://doi.org/10.1002/pro.3280.

K777 (CHAGAS). . [*S. l.*: *s. n.*], 2014. Disponível em: https://dndi.org/research-development/portfolio/k777/.

KANDI, V.; VADAKEDATH, S. Clinical Trials and Clinical Research: A Comprehensive Review. **Cureus**, [*s. l.*], 16 fev. 2023. DOI 10.7759/cureus.35077. Disponível em: https://www.cureus.com/articles/128436-clinical-trials-and-clinical-research-a-comprehensive-review. Acesso em: 25 mar. 2025.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. Infection and invasion mechanisms of Trypanosoma cruzi in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. **Biological Research**, [*s. l.*], v. 43, n. 3, 2010. DOI 10.4067/S0716-97602010000300007. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-97602010000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 19 mar. 2025.

KERR, I. D.; LEE, J. H.; FARADY, C. J.; MARION, R.; RICKERT, M.; SAJID, M.; PANDEY, K. C.; CAFFREY, C. R.; LEGAC, J.; HANSELL, E.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; ROSENTHAL, P. J.; BRINEN, L. S. Vinyl Sulfones as Antiparasitic Agents and a Structural Basis for Drug Design. **Journal of Biological Chemistry**, [*s. l.*], v. 284, n. 38, p. 25697–25703, set. 2009. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014340.

KHARE, S.; NAGLE, A. S.; BIGGART, A.; LAI, Y. H.; LIANG, F.; DAVIS, L. C.; BARNES, S. W.; MATHISON, C. J. N.; MYBURGH, E.; GAO, M.-Y.; GILLESPIE, J. R.; LIU, X.; TAN, J. L.; STINSON, M.; RIVERA, I. C.; BALLARD, J.; YEH, V.; GROESSL, T.; FEDERE, G.; KOH, H. X. Y.; VENABLE, J. D.; BURSULAYA, B.; SHAPIRO, M.; MISHRA, P. K.;

SPRAGGON, G.; BROCK, A.; MOTTRAM, J. C.; BUCKNER, F. S.; RAO, S. P. S.; WEN, B. G.; WALKER, J. R.; TUNTLAND, T.; MOLTENI, V.; GLYNNE, R. J.; SUPEK, F. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, [*s. l.*], v. 537, n. 7619, p. 229–233, set. 2016. https://doi.org/10.1038/nature19339.

KOSEC, G.; ALVAREZ, V.; J. CAZZULO, J. Cysteine proteinases of Trypanosoma cruzi: from digestive enzymes to programmed cell death mediators. **BIOCELL**, [*s. l.*], v. 30, n. 3, p. 479–490, 2006. https://doi.org/10.32604/biocell.2006.30.479.

KRIEGER, E.; JOO, K.; LEE, J.; LEE, J.; RAMAN, S.; THOMPSON, J.; TYKA, M.; BAKER, D.; KARPLUS, K. Improving physical realism, stereochemistry, and side-chain accuracy in homology modeling: Four approaches that performed well in CASP8. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [*s. l.*], v. 77, n. S9, p. 114–122, jan. 2009. https://doi.org/10.1002/prot.22570.

LASKOWSKI, R.; DE BEER, T. Root Mean Square Deviation (RMSD). *In*: HANCOCK, J. M.; ZVELEBIL, M. J. (orgs.). **Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology**. 1. ed. [*S. l.*]: Wiley, 2004. DOI 10.1002/9780471650126.dob0640.pub2. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780471650126.dob0640.pub2. Acesso em: 25 mar. 2025.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, [*s. l.*], v. 13, n. 4, p. 342–348, abr. 2013. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1.

LEMKUL, J. A. Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS. **The Journal of Physical Chemistry B**, [*s. l.*], v. 128, n. 39, p. 9418–9435, 3 out. 2024. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.4c04901.

LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; GAUNT, M. W.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; MILES, M. A. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in Trypanosoma cruzi populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal for Parasitology**, [*s. l.*], v. 39, n. 12, p. 1305–1317, out. 2009. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.001.

LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; YEO, M.; ACOSTA, N.; GAUNT, M. W.; MILES, M. A. Recent, Independent and Anthropogenic Origins of Trypanosoma cruzi Hybrids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [*s. l.*], v. 5, n. 10, p. e1363, 11 out. 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001363.

LI, L.; CHENNA, B. C.; YANG, K. S.; COLE, T. R.; GOODALL, Z. T.; GIARDINI, M.; MOGHADAMCHARGARI, Z.; HERNANDEZ, E. A.; GOMEZ, J.; CALVET, C. M.; BERNATCHEZ, J. A.; MELLOTT, D. M.; ZHU, J.; RADEMACHER, A.; THOMAS, D.; BLANKENSHIP, L. R.; DRELICH, A.; LAGANOWSKY, A.; TSENG, C.-T. K.; LIU, W. R.; WAND, A. J.; CRUZ-REYES, J.; SIQUEIRA-NETO, J. L.; MEEK, T. D. Self-Masked Aldehyde Inhibitors: A Novel Strategy for Inhibiting Cysteine Proteases. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 64, n. 15, p. 11267–11287, 12 ago. 2021. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00628.

LIMA, A. P. C. A.; ALMEIDA, P. C.; TERSARIOL, I. L. S.; SCHMITZ, V.; SCHMAIER, A. H.; JULIANO, L.; HIRATA, I. Y.; MÜLLER-ESTERL, W.; CHAGAS, J. R.; SCHARFSTEIN,

J. Heparan Sulfate Modulates Kinin Release by Trypanosoma cruzi through the Activity of Cruzipain. **Journal of Biological Chemistry**, [*s. l.*], v. 277, n. 8, p. 5875–5881, fev. 2002. https://doi.org/10.1074/jbc.M108518200.

LIMA, A. P. C. A.; DOS REIS, F. C. G.; SERVEAU, C.; LALMANACH, G.; JULIANO, L.; MÉNARD, R.; VERNET, T.; THOMAS, D. Y.; STORER, A. C.; SCHARFSTEIN, J. Cysteine protease isoforms from Trypanosoma cruzi, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 114, n. 1, p. 41–52, abr. 2001. https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00236-5.

LINDORFF-LARSEN, K.; PIANA, S.; PALMO, K.; MARAGAKIS, P.; KLEPEIS, J. L.; DROR, R. O.; SHAW, D. E. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. **Proteins**, [*s. l.*], v. 78, n. 8, p. 1950–1958, jun. 2010. https://doi.org/10.1002/prot.22711.

LOSINNO, A. D.; MARTÍNEZ, S. J.; LABRIOLA, C. A.; CARRILLO, C.; ROMANO, P. S. Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Autophagy**, [*s. l.*], v. 17, n. 2, p. 439–456, 1 fev. 2021. https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1720428.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic Variability of Trypanosoma cruzi:Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitology Today**, [*s. l.*], v. 14, n. 3, p. 119–124, mar. 1998. https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01179-4.

MANTILLA, J. C.; ZAFRA, G. A.; MACEDO, A. M.; GONZÁLEZ, C. I. Mixed infection of Trypanosoma cruzi I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. **Human Pathology**, [*s. l.*], v. 41, n. 4, p. 610–613, abr. 2010. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.11.005.

MCGRATH, M. E.; EAKIN, A. E.; ENGEL, J. C.; MCKERROW, J. H.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. The Crystal Structure of Cruzain: A Therapeutic Target for Chagas' Disease. **Journal of Molecular Biology**, [*s. l.*], v. 247, n. 2, p. 251–259, mar. 1995. https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0137.

MEIRELLES, M. N. L.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S. G.; COSTA, E. M.; MURTA, A. C. M.; SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of Trypanosoma cruzi in vitro. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [*s. l.*], v. 52, n. 2, p. 175–184, jun. 1992. https://doi.org/10.1016/0166-6851(92)90050-T.

MENG, E. C.; GODDARD, T. D.; PETTERSEN, E. F.; COUCH, G. S.; PEARSON, Z. J.; MORRIS, J. H.; FERRIN, T. E. UCSF ChimeraX : Tools for structure building and analysis. **Protein Science**, [*s. l.*], v. 32, n. 11, p. e4792, nov. 2023. https://doi.org/10.1002/pro.4792.

MOLINA, I.; GÓMEZ I PRAT, J.; SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; SERRE, N.; POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, [*s. l.*], v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 15 maio 2014. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313122.

MORILLO, C. A.; WASKIN, H.; SOSA-ESTANI, S.; DEL CARMEN BANGHER, M.; CUNEO, C.; MILESI, R.; MALLAGRAY, M.; APT, W.; BELOSCAR, J.; GASCON, J.; MOLINA, I.; ECHEVERRIA, L. E.; COLOMBO, H.; PEREZ-MOLINA, J. A.; WYSS, F.;

MEEKS, B.; BONILLA, L. R.; GAO, P.; WEI, B.; MCCARTHY, M.; YUSUF, S.; MORILLO, C.; SOSA-ESTANI, S.; WASKIN, H.; MEEKS, B.; YUSUF, S.; DIAZ, R.; ACQUATELLA, H.; LAZZARI, J.; ROBERTS, R.; TRAINA, M.; MEEKS, B.; BONILLA, L. R.; GAO, P.; TAYLOR, A.; HOLADYK-GRIS, I.; WHALEN, L.; BANGHER, M. C.; ROMERO, M. A.; PRADO, N.; HERNÁNDEZ, Y.; FERNANDEZ, M.; RIARTE, A.; SCOLLO, K.; LOPEZ-ALBIZU, C.; CUNEO, C. A.; GUTIÉRREZ, N. C.; MILESI, R. R.; BERLI, M. A.; MALLAGRAY, M. H.; CÁCERES, N. E.; BELOSCAR, J. S.; PETRUCCI, J. M.; COLOMBO, H.; DELLATORRE, M.; PRADO, A.; APT, W.; ZULANTAY, I.; ECHEVERRÍA, L. E.; ISAZA, D.; REYES, E.; WYSS, F. S.; FIGUEROA, A.; GUZMÁN MELGAR, I.; RODRÍGUEZ, E.; GASCON, J.; ALDASORO, E.; POSADA, E. J.; SERRET, N.; MOLINA, I.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; PEREZ-MOLINA, J. A.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; REYES-LÓPEZ, P. A. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers. **Journal of the American College of Cardiology**, [*s. l.*], v. 69, n. 8, p. 939–947, fev. 2017. https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.12.023.

MOTT, B. T.; FERREIRA, R. S.; SIMEONOV, A.; JADHAV, A.; ANG, K. K.-H.; LEISTER, W.; SHEN, M.; SILVEIRA, J. T.; DOYLE, P. S.; ARKIN, M. R.; MCKERROW, J. H.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; THOMAS, C. J.; SHOICHET, B. K.; MALONEY, D. J. Identification and Optimization of Inhibitors of Trypanosomal Cysteine Proteases: Cruzain, Rhodesain, and TbCatB. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 53, n. 1, p. 52–60, 14 jan. 2010. https://doi.org/10.1021/jm901069a.

NAGLE, A.; BIGGART, A.; BE, C.; SRINIVAS, H.; HEIN, A.; CARIDHA, D.; SCIOTTI, R. J.; PYBUS, B.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; BURSULAYA, B.; LAI, Y. H.; GAO, M.-Y.; LIANG, F.; MATHISON, C. J. N.; LIU, X.; YEH, V.; SMITH, J.; LERARIO, I.; XIE, Y.; CHIANELLI, D.; GIBNEY, M.; BERMAN, A.; CHEN, Y.-L.; JIRICEK, J.; DAVIS, L. C.; LIU, X.; BALLARD, J.; KHARE, S.; EGGIMANN, F. K.; LUNEAU, A.; GROESSL, T.; SHAPIRO, M.; RICHMOND, W.; JOHNSON, K.; RUDEWICZ, P. J.; RAO, S. P. S.; THOMPSON, C.; TUNTLAND, T.; SPRAGGON, G.; GLYNNE, R. J.; SUPEK, F.; WIESMANN, C.; MOLTENI, V. Discovery and Characterization of Clinical Candidate LXE408 as a Kinetoplastid-Selective Proteasome Inhibitor for the Treatment of Leishmaniases. **Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 63, n. 19, p. 10773–10781, 8 out. 2020. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00499.

NDAO, M.; BEAULIEU, C.; BLACK, W. C.; ISABEL, E.; VASQUEZ-CAMARGO, F.; NATH-CHOWDHURY, M.; MASSÉ, F.; MELLON, C.; METHOT, N.; NICOLL-GRIFFITH, D. A. Reversible Cysteine Protease Inhibitors Show Promise for a Chagas Disease Cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [*s. l.*], v. 58, n. 2, p. 1167–1178, fev. 2014. https://doi.org/10.1128/AAC.01855-13.

NEITZ, R. J.; BRYANT, C.; CHEN, S.; GUT, J.; HUGO CASELLI, E.; PONCE, S.; CHOWDHURY, S.; XU, H.; ARKIN, M. R.; ELLMAN, J. A.; RENSLO, A. R. Tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors with improved pharmacokinetic properties as therapeutic leads for Chagas' disease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [*s. l.*], v. 25, n. 21, p. 4834–4837, nov. 2015. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.06.066.

OANCA, G.; ASADI, M.; SAHA, A.; RAMACHANDRAN, B.; WARSHEL, A. Exploring the Catalytic Reaction of Cysteine Proteases. **The Journal of Physical Chemistry B**, [*s. l.*], v. 124, n. 50, p. 11349–11356, 17 dez. 2020. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c08192.

O'BOYLE, N. M.; BANCK, M.; JAMES, C. A.; MORLEY, C.; VANDERMEERSCH, T.; HUTCHISON, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, [*s. l.*], v. 3, n. 1, p. 33, dez. 2011. https://doi.org/10.1186/1758-2946-3-33.

PAULI, I.; REZENDE JR., C. D. O.; SLAFER, B. W.; DESSOY, M. A.; DE SOUZA, M. L.; FERREIRA, L. L. G.; ADJANOHUN, A. L. M.; FERREIRA, R. S.; MAGALHÃES, L. G.; KROGH, R.; MICHELAN-DUARTE, S.; DEL PINTOR, R. V.; DA SILVA, F. B. R.; CRUZ, F. C.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Multiparameter Optimization of Trypanocidal Cruzain Inhibitors With In Vivo Activity and Favorable Pharmacokinetics. **Frontiers in Pharmacology**, [*s. l.*], v. 12, p. 774069, 5 jan. 2022. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.774069.

PEREIRA, G. A. N.; DA SILVA, E. B.; BRAGA, S. F. P.; LEITE, P. G.; MARTINS, L. C.; VIEIRA, R. P.; SOH, W. T.; VILLELA, F. S.; COSTA, F. M. R.; RAY, D.; DE ANDRADE, S. F.; BRANDSTETTER, H.; OLIVEIRA, R. B.; CAFFREY, C. R.; MACHADO, F. S.; FERREIRA, R. S. Discovery and characterization of trypanocidal cysteine protease inhibitors from the 'malaria box'. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 179, p. 765–778, out. 2019. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.062.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, [*s. l.*], v. 391, n. 10115, p. 82–94, jan. 2018. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4.

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, [*s. l.*], v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004. https://doi.org/10.1002/jcc.20084.

PINHEIRO, E.; BRUM-SOARES, L.; REIS, R.; CUBIDES, J.-C. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [*s. l.*], v. 50, n. 3, p. 296–300, jun. 2017. https://doi.org/10.1590/0037-8682-0433-2016.

POVEDA, C.; FRESNO, M.; GIRONÈS, N.; MARTINS-FILHO, O. A.; RAMÍREZ, J. D.; SANTI-ROCCA, J.; MARIN-NETO, J. A.; MORILLO, C. A.; ROSAS, F.; GUHL, F. Cytokine Profiling in Chagas Disease: Towards Understanding the Association with Infecting Trypanosoma cruzi Discrete Typing Units (A BENEFIT TRIAL Sub-Study). **PLoS ONE**, [*s. l.*], v. 9, n. 3, p. e91154, 7 mar. 2014. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091154.

PUBMED. [*S. l.*: *s. n.*], 2025. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [*s. l.*], v. 104, n. suppl 1, p. 152–158, jul. 2009. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900021.

RODRIGUEZ, H. O.; GUERRERO, N. A.; FORTES, A.; SANTI-ROCCA, J.; GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Trypanosoma cruzi strains cause different myocarditis patterns in infected mice. **Acta Tropica**, [*s. l.*], v. 139, p. 57–66, nov. 2014. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.005.

ROGERS, K. E.; KERÄNEN, H.; DURRANT, J. D.; RATNAM, J.; DOAK, A.; ARKIN, M. R.; MCCAMMON, J. A. Novel Cruzain Inhibitors for the Treatment of Chagas' Disease.

Chemical Biology & Drug Design, [*s. l.*], v. 80, n. 3, p. 398–405, set. 2012. https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2012.01416.x.

ROUSH, W. R.; GONZÁLEZ, F. V.; MCKERROW, J. H.; HANSELL, E. Design and synthesis of dipeptidyl α′,β′-epoxy ketones, potent irreversible inhibitors of the cysteine protease cruzain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [*s. l.*], v. 8, n. 19, p. 2809–2812, out. 1998. https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00494-6.

ROUX, B.; CHIPOT, C. Editorial Guidelines for Computational Studies of Ligand Binding Using MM/PBSA and MM/GBSA Approximations Wisely. **The Journal of Physical Chemistry B**, [*s. l.*], v. 128, n. 49, p. 12027–12029, 12 dez. 2024. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.4c06614.

RUSSOMANDO, G.; DE TOMASSONE, M. M.; DE GUILLEN, I.; ACOSTA, N.; VERA, N.; ALMIRON, M.; CANDIA, N.; CALCENA, M. F.; FIGUEREDO, A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, [*s. l.*], v. 59, n. 3, p. 487–491, set. 1998. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.487.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. **Journal of Molecular Biology**, [*s. l.*], v. 234, n. 3, p. 779–815, dez. 1993. https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626.

SANDER, T.; FREYSS, J.; VON KORFF, M.; RUFENER, C. DataWarrior: An Open-Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [*s. l.*], v. 55, n. 2, p. 460–473, 23 fev. 2015. https://doi.org/10.1021/ci500588j.

SANTOS, V. C.; LEITE, P. G.; SANTOS, L. H.; PASCUTTI, P. G.; KOLB, P.; MACHADO, F. S.; FERREIRA, R. S. Structure-based discovery of novel cruzain inhibitors with distinct trypanocidal activity profiles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [*s. l.*], v. 257, p. 115498, set. 2023. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115498.

SANTOS, V. C.; OLIVEIRA, A. E. R.; CAMPOS, A. C. B.; REIS-CUNHA, J. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; TEIXEIRA, S. M. R.; LIMA, A. P. C. A.; FERREIRA, R. S. The gene repertoire of the main cysteine protease of Trypanosoma cruzi, cruzipain, reveals four sub-types with distinct active sites. **Scientific Reports**, [*s. l.*], v. 11, n. 1, p. 18231, 14 set. 2021. https://doi.org/10.1038/s41598-021-97490-2.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [*s. l.*], v. 27, n. 2, p. 157–162, abr. 1967. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(67)80055-X.

SCHIJMAN, A. G. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [*s. l.*], v. 52, n. 3, p. 441–449, 13 ago. 2003. https://doi.org/10.1093/jac/dkg338.

SCHIJMAN, Alejandro Gabriel; ALONSO-PADILLA, J.; BRITTO, C.; HERRERA BERNAL, C. P. Retrospect, advances and challenges in Chagas disease diagnosis: a comprehensive review. **The Lancet Regional Health - Americas**, [*s. l.*], v. 36, p. 100821, ago. 2024. https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100821.

SCHRÖDINGER, LLC. **The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8**. [*s. l.*], nov. 2015. .

SILVA, J. R. A.; CIANNI, L.; ARAUJO, D.; BATISTA, P. H. J.; DE VITA, D.; ROSINI, F.; LEITÃO, A.; LAMEIRA, J.; MONTANARI, C. A. Assessment of the Cruzain Cysteine Protease Reversible and Irreversible Covalent Inhibition Mechanism. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [*s. l.*], v. 60, n. 3, p. 1666–1677, 23 mar. 2020. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b01138.

SILVESTRINI, M. M. A.; ALESSIO, G. D.; FRIAS, B. E. D.; SALES JÚNIOR, P. A.; ARAÚJO, M. S. S.; SILVESTRINI, C. M. A.; BRITO ALVIM DE MELO, G. E.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS, H. R. **Frontiers in Immunology**, [*s. l.*], v. 15, p. 1342431, 9 abr. 2024. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1342431.

ŚLEDŹ, P.; CAFLISCH, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. **Current Opinion in Structural Biology**, [*s. l.*], v. 48, p. 93–102, fev. 2018. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.10.010.

STEIN, R. M.; YANG, Y.; BALIUS, T. E.; O'MEARA, M. J.; LYU, J.; YOUNG, J.; TANG, K.; SHOICHET, B. K.; IRWIN, J. J. Property-Unmatched Decoys in Docking Benchmarks. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [*s. l.*], v. 61, n. 2, p. 699–714, 22 fev. 2021. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00598.

STERLING, T.; IRWIN, J. J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [*s. l.*], v. 55, n. 11, p. 2324–2337, 23 nov. 2015. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00559.

SUBILEAU, M.; BARNABÉ, C.; DOUZERY, E. J. P.; DIOSQUE, P.; TIBAYRENC, M. Trypanosoma cruzi: New insights on ecophylogeny and hybridization by multigene sequencing of three nuclear and one maxicircle genes. **Experimental Parasitology**, [*s. l.*], v. 122, n. 4, p. 328–337, ago. 2009. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.04.008.

SUN, D.; GAO, W.; HU, H.; ZHOU, S. Why 90% of clinical drug development fails and how to improve it? **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [*s. l.*], v. 12, n. 7, p. 3049–3062, jul. 2022. https://doi.org/10.1016/j.apsb.2022.02.002.

TESTON, A. P. M.; MONTEIRO, W. M.; REIS, D.; BOSSOLANI, G. D. P.; GOMES, M. L.; DE ARAÚJO, S. M.; BAHIA, M. T.; BARBOSA, M. G. V.; TOLEDO, M. J. O. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *T rypanosoma cruzi* strains from the western B razilian A mazon. **Tropical Medicine & International Health**, [*s. l.*], v. 18, n. 1, p. 85–95, jan. 2013. https://doi.org/10.1111/tmi.12014.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends in Parasitology**, [*s. l.*], v. 18, n. 9, p. 405–410, set. 2002. https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02357-7.

TOLEDO, M. J. D. O.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A.; TIBAYRENC, M.; BARNABÉ, C.; TAFURI, W. L.; DE LANA, M. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for Mice Infected with Different *Trypanosoma cruzi* Clonal Genotypes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [*s. l.*], v. 47, n. 1, p. 223–230, jan. 2003. https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.223-230.2003.

TOMAS, A. M.; MILES, M. A.; KELLY, J. M. Overexpression of Cruzipain, the Major Cysteine Proteinase of *Trypanosoma cruzi* , is Associated with Enhanced Metacyclogenesis. **European Journal of Biochemistry**, [*s. l.*], v. 244, n. 2, p. 596–603, mar. 1997. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00596.x.

TORRICO, F.; GASCÓN, J.; BARREIRA, F.; BLUM, B.; ALMEIDA, I. C.; ALONSO-VEGA, C.; BARBOZA, T.; BILBE, G.; CORREIA, E.; GARCIA, W.; ORTIZ, L.; PARRADO, R.; RAMIREZ, J. C.; RIBEIRO, I.; STRUB-WOURGAFT, N.; VAILLANT, M.; SOSA-ESTANI, S.; ARTEAGA, R.; DE LA BARRA, A.; CAMACHO BORJA, J.; MARTINEZ, I.; FERNANDES, J.; GARCIA, L.; LOZANO, D.; PALACIOS, A.; SCHIJMAN, A.; PINAZO, M. J.; PINTO, J.; ROJAS, G.; ESTEVAO, I.; ORTEGA-RODRIGUEZ, U.; MENDES, M. T.; SCHUCK, E.; HATA, K.; MAKI, N.; ASADA, M. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. **The Lancet Infectious Diseases**, [*s. l.*], v. 21, n. 8, p. 1129–1140, ago. 2021. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30844-6.

TRUCHON, J.-F.; BAYLY, C. I. Evaluating Virtual Screening Methods: Good and Bad Metrics for the “Early Recognition” Problem. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [*s. l.*], v. 47, n. 2, p. 488–508, 1 mar. 2007. https://doi.org/10.1021/ci600426e.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, [*s. l.*], v. 5, n. 9, p. 785–799, set. 2006. https://doi.org/10.1038/nrd2092.

VALLEJO, M.; REYES, P. P.; MARTINEZ GARCIA, M.; GONZALEZ GARAY, A. G. Trypanocidal drugs for late-stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [*s. l.*], v. 2020, n. 12, 11 dez. 2020. DOI 10.1002/14651858.CD004102.pub3. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD004102.pub3. Acesso em: 9 mar. 2025.

VANOMMESLAEGHE, K.; HATCHER, E.; ACHARYA, C.; KUNDU, S.; ZHONG, S.; SHIM, J.; DARIAN, E.; GUVENCH, O.; LOPES, P.; VOROBYOV, I.; MACKERELL, A. D. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, [*s. l.*], v. 31, n. 4, p. 671–690, mar. 2010. https://doi.org/10.1002/jcc.21367.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M. G.; POSTAN, M.; ARMENTI, A. Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment: A Nonrandomized Trial. **Annals of Internal Medicine**, [*s. l.*], v. 144, n. 10, p. 724–734, 16 maio 2006. https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00006.

WANG, C.; GREENE, D.; XIAO, L.; QI, R.; LUO, R. Recent Developments and Applications of the MMPBSA Method. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [*s. l.*], v. 4, p. 87, 10 jan. 2018. https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00087.

WANG, L.; WANG, N.; ZHANG, W.; CHENG, X.; YAN, Z.; SHAO, G.; WANG, X.; WANG, R.; FU, C. Therapeutic peptides: current applications and future directions. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 48, 14 fev. 2022. https://doi.org/10.1038/s41392-022-00904-4.

WANG, Z.; WANG, X.; LI, Y.; LEI, T.; WANG, E.; LI, D.; KANG, Y.; ZHU, F.; HOU, T. farPPI: a webserver for accurate prediction of protein-ligand binding structures for small-molecule PPI inhibitors by MM/PB(GB)SA methods. **Bioinformatics**, [*s. l.*], v. 35, n. 10, p. 1777–1779, 15 maio 2019. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty879.

WESTENBERGER, S. J.; CERQUEIRA, G. C.; EL-SAYED, N. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; STURM, N. R. Trypanosoma cruzi mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics**, [*s. l.*], v. 7, n. 1, p. 60, dez. 2006. https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-60.

WHO EXPERT COMMITTEE. Control of Chagas disease. **World Health Organization Technical Report Series**, [*s. l.*], v. 905, p. i–vi, 1–109, back cover, 2002. .

WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; FERNANDES, W. B.; SESTI-COSTA, R.; CARNEIRO, Z. A.; CHELESKI, J.; DA SILVA, A. B. F.; JULIANO, L.; CEZARI, M. H. S.; SILVA, J. S.; MCKERROW, J. H.; MONTANARI, C. A. Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [*s. l.*], v. 7, n. 8, p. e2370, 22 ago. 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002370.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease**. [*S. l.*: *s. n.*], 2024. Disponível em: https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis).

YAMAGATA, Y.; NAKAGAWA, J. Control of Chagas Disease. **Advances in Parasitology**. [*S. l.*]: Elsevier, 2006. v. 61, p. 129–165. DOI 10.1016/S0065-308X(05)61004-4. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X05610044. Acesso em: 9 mar. 2025.

YEO, M.; MAURICIO, I. L.; MESSENGER, L. A.; LEWIS, M. D.; LLEWELLYN, M. S.; ACOSTA, N.; BHATTACHARYYA, T.; DIOSQUE, P.; CARRASCO, H. J.; MILES, M. A. Multilocus Sequence Typing (MLST) for Lineage Assignment and High Resolution Diversity Studies in Trypanosoma cruzi. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [*s. l.*], v. 5, n. 6, p. e1049, 21 jun. 2011. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001049.

ZHAI, X.; MEEK, T. D. Catalytic Mechanism of Cruzain from *Trypanosoma cruzi* As Determined from Solvent Kinetic Isotope Effects of Steady-State and Pre-Steady-State Kinetics. **Biochemistry**, [*s. l.*], v. 57, n. 22, p. 3176–3190, 5 jun. 2018. https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01250.

ZINGALES, B; ANDRADE, S.; BRIONES, M.; CAMPBELL, D.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.; MACHADO, C.; MILES, M.; ROMANHA, A.; STURM, N.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [*s. l.*], v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009. https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021.

ZINGALES, Bianca. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, [*s. l.*], v. 184, p. 38–52, ago. 2018. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017.

ANEXO 1

Tabela A1 - Conjunto de ativos que foram selecionados para este trabalho. Ao todo, 111 inibidores da cruzaína.

aid	sid	cid	PUBCHEM_OPENEYE_CAN_SMILES	IC_{50}	Ki	Paper
491940	103710785	661700	C1COCCN1CCCNC2=NC=NC3=C2NC4=C3C=C(C=C4)Cl	-	2	(Ferreira et al., 2010)
491940	103769555	1183113	C1=CC=C2C(=C1)NC(=N2)CCNC(=O)COC3=CC=CC=C3Br	-	2	(Ferreira et al., 2010)
491940	103769554	3556842	CC(C)CC(C(=O)OCC(=O)NC1=CC(=C(C=C1)OC)Cl)N2C(=O)C3CC=CCC3C2=O	-	0.8	(Ferreira et al., 2010)
491940	103769101	4438641	C1=CC=C(C=C1)C(C(=O)NC2=C(C=CC(=C2)C(F)(F)F)Cl)OC(=O)CNC(=O)C3=CC=CC=C3	-	0.07	(Ferreira et al., 2010)
491941	103769042	4313265	C1COC2=C(O1)C=CC(=C2)C(=O)COC(=O)CNC(=O)C3=CC=C(C=C3)Cl	0.5	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103769553	49799570	C1=CC=C(C=C1)C(C(=O)NC2=C(C=C(C=C2)Cl)C(F)(F)F)OC(=O)CNC(=O)C3=CC=C(C=C3)Cl	0.7	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103768494	2998924	CC(C)C(C(=O)NCC(C1=CC=CO1)N2CCCCC2)NC(=O)C3=CC=CO3	7.0	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103769041	1616653	CC1=CC=CC=C1OCC(=O)NCC(=O)OCC(=O)C2=CC3=CC=CC=C3C=C2	0.7	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103769552	3888858	CC1=CC(=NO1)NC(=O)COC(=O)C(CC2=CNC3=CC=CC=C32)NC(=O)C4=CC=C(C=C4)F	3.0	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103768491	4437145	CC1=C(C=CC(=C1)C(=O)NCC(=O)OC(C2=CC=CC=C2)C(=O)NC3=C(C=CC(=C3)C(F)(F)F)Cl)[N+](=O)[O-]	0.4	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103768493	3976161	CC(C)CC(C(=O)OCC(=O)NC1=C(C=CC(=C1)Cl)OC)N2C(=O)C3CC=CCC3C2=O	1.0	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103769102	4875671	CC1=CC(=C(N1CCOC)C)C(=O)COC(=O)CNC(=O)C2=CC=CC=C2	18.0	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103768492	3000182	CC1=CC(=NO1)NC(=O)COC(=O)C(CC2=CC=CC=C2)NC(=O)C3=CC=CO3	38.0	-	(Ferreira et al., 2010)
491941	103769219	4592377	CC(C(=O)OC(C1=CC=CC=C1)C(=O)NC2=C(C=CC(=C2)C(F)(F)F)Cl)NC(=O)C3=CC=CC=C3Cl	11.0	-	(Ferreira et al., 2010)
1128395	242619873	90655108	C1=CC=C2C(=C1)C=CC(=C2Br)OCC(=O)NCCC3=NC4=C(N3)C=C(C=C4)Cl	0.6	-	(Ferreira et al., 2014)

1128395	242619837	90655102	C1=CC=C2C(=C1)NC(=N2)CCNC(=O)COC3=CC=CC=C3I	1.6	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619842	19171432	C1=CC=C2C(=C1)NC(=N2)CCNC(=O)COC3=CC(=CC=C3)Br	0.8	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619843	17414912	C1=CC=C2C(=C1)NC(=N2)CCNC(=O)COC3=CC=C(C=C3)Br	2.7	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619844	21008970	C1=CC=C2C(=C1)C=CC=C2OCC(=O)NCCC3=NC4=CC=CC=C4N3	5.2	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619845	17456138	C1=CC=C2C=C(C=CC2=C1)OCC(=O)NCCC3=NC4=CC=CC=C4N3	3.0	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619835	30209012	C1=CC=C2C(=C1)NC(=N2)CCNC(=O)COC3=CC=CC=C3F	5.3	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619836	2066617	C1=CC=C2C(=C1)NC(=N2)CCNC(=O)COC3=CC=CC=C3Cl	3.0	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242158901	724128	CC1=CC=CC=C1OCC(=O)NCCC2=NC3=CC=CC=C3N2	4.1	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619874	90655109	COC1=CC2=C(C=C1)N=C(N2)CCNC(=O)COC3=C(C4=CC=CC=C4C=C3)Br	0.54	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619871	90655107	CC(=O)N1C2=CC=CC=C2N=C1CCNC(=O)COC3=CC=C(C=C3)Br	9.9	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619875	90655110	CC1=CC2=C(C=C1)N=C(N2)CCNC(=O)COC3=C(C4=CC=CC=C4C=C3)Br	0.62	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619848	90655105	C1=CC=C2C(=C1)C=CC(=C2O)OCC(=O)NCCC3=NC4=CC=CC=C4N3	8.2	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619839	2263233	C1=CC=C2C(=C1)NC(=N2)CCNC(=O)COC3=CC=CC=C3[N+](=O)[O-]	13.2	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619851	21008988	C1=CC=C(C=C1)SCC(=O)NCCC2=NC3=CC=CC=C3N2	38.4	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242367868	721475	C1=CC=C(C=C1)OCC(=O)NCCC2=NC3=CC=CC=C3N2	10.9	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619850	49853260	C1=CC=C(C(=C1)CCC(=O)NCCC2=NC3=CC=CC=C3N2)Br	77.5	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619838	18143836	C1=CC=C(C(=C1)C#N)OCC(=O)NCCC2=NC3=CC=CC=C3N2	65.1	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619846	90655103	C1=CC=C2C(=C1)C=CC(=C2C=O)OCC(=O)NCCC3=NC4=CC=CC=C4N3	13.5	-	(Ferreira et al., 2014)

1128395	242619870	90655106	C=CCCN1C2=CC=CC=C2N=C1CCNC(=O)COC3=CC=CC=C3Cl	23.9	-	(Ferreira et al., 2014)
1128395	242619847	90655104	C1=CC=C2C(=C1)C=CC(=C2CO)OCC(=O)NCCC3=NC4=CC=CC=C4N3	12.7	-	(Ferreira et al., 2014)
1128396	242619849	37020172	C1=CC=C2C(=C1)C=CC(=C2Br)OCC(=O)NCCC3=NC4=CC=CC=C4N3	-	0.082	(Ferreira et al., 2014)
1432587	103204189	4650466	C1=CC2=C(C=CN=C2C=C1Cl)NCCO	62.0	-	(Braga *et al.*, 2017)
1432587	103650131	370995	C1=CC2=C(C=CN=C2C=C1Cl)NCCCO	28.0	-	(Braga *et al.*, 2017)
1432587	123083287	43091000	C1COCCN1CCCNC2=C3C=CC(=CC3=NC=C2)Cl	15.0	-	(Braga *et al.*, 2017)
1432587	103656150	4798096	C1=CC=C(C=C1)CNC2=C3C=CC(=CC3=NC=C2)Cl	44.0	-	(Braga *et al.*, 2017)
1432587	103390228	9926053	C1COCCN1CCNC2=C3C=CC(=CC3=NC=C2)Cl	41.0	-	(Braga *et al.*, 2017)
1508567	336874541	127031325	CC1=CSC(=N1)NN=C(C)C2=CC(=C(C=C2)Cl)Cl	0.6	-	(De Oliveira Filho *et al.*, 2017)
1508567	404669225	145961420	CC1=C(SC(=N1)NN=C(C)C2=CC(=C(C=C2)Cl)Cl)C	9.0	-	(De Oliveira Filho *et al.*, 2017)
1673572	461558126	17151695	C1CNCCC1CNCC2=CC=C(O2)C3=C(C=C(C=C3)Br)Cl.Cl.Cl	26.0	-	(Pereira *et al.*, 2019)
1673572	103710511	805487	C1=CC=C(C=C1)CNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=CC=CC=C4	9.0	-	(Pereira *et al.*, 2019)
1773672	469804959	164613491	C1COCCN1CCNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=CC=C(C=C4)Cl	2.5	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	469812914	52110135	C1=CC=C2C(=C1)C(=NC(=N2)NC3=CC=C(C=C3)Cl)NCCCO	7.3	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	469802379	2351737	C1=CC=C(C=C1)CNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=CC=C(C=C4)Cl	2.4	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	469809498	164616764	C1COCCN1C(=O)C2=CC=C(C=C2)NC3=NC4=CC=CC=C4C(=N3)NCC5=CC=CC=C5	7.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	469813370	164619569	C1=CC=C(C=C1)CNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=NC=CS4	16.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	103667408	962695	C1=CC=C(C=C1)CNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=CC(=CC=C4)O	18.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)

1773672	469801629	164611079	C1COCCN1C(=O)C2=CC=C(C=C2)NC3=NC4=CC=CC=C4C(=N3)NCCCO	15.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	103657683	962696	C1=CC=C(C=C1)CNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=CC=C(C=C4)O	18.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	469803024	164612092	C1COCCN1CCNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=CC=C(C=C4)C(=O)N5CCOCC5	13.5	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	469808118	164615754	C1=CC=C2C(=C1)C(=NC(=N2)NCCCO)NC3=CC(=CC=C3)F	25.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773672	469822639	52110740	C1=CC=C(C=C1)CNC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NCCCO	22.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773673	103181525	213847	C1=CC=C(C=C1)NC2=NC(=NC3=CC=CC=C32)NC4=CC=CC=C4	14.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1773673	103709792	1330474	COC1=CC=C(C=C1)NC2=NC3=CC=CC=C3C(=N2)NCC4=CC=CC=C4	52.0	-	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2021)
1799758	160844857	70701962	CC1=CC=C(N1)C(=O)OC2C(C(OC(C2OC)(C)C)OC3=C(C4=C(C=C3)C(=C(C(=O)O4)NC(=O)C5=CC(=C(C=C5)O)CC=C(C)C)O)Cl)O	16.0	-	(Rogers *et al.*, 2012)
1799758	160844858	249307	C1CN=C(N1)C2=CC=C(C=C2)NC(=O)C3=CC(=C(C=C3)Cl)C(=O)NC4=CC=C(C=C4)C5=NCCN5	66.0	-	(Rogers *et al.*, 2012)
1799758	252633377	319089	CN1C=CC(=NC2=CC=C(C=C2)NC(=O)C3=CC=C(C=C3)N=C4C=CN(C5=C4C=C(C=C5)[N+](=O)[O-])C)C=C1	63.0	-	(Rogers *et al.*, 2012)
-	-	"D12"	O=S(=O)(O)c1ccc(-n2c(-c3ccccc3)nnc2-c2ccc(-c3ccccc3)cc2)cc1	<10	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC5223994/27 80646	C1=CC(=CC(=C1)NC(=S)NC(=O)C2=CC3=NO[N+](=C3C=C2)[O-])C(F)(F)F	4.8	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC1038200/28 20493	CN1C(=CC(=N1)C(F)(F)F)C2=CC=C(S2)NC(=O)NC3=CC=CC(=C3)C(F)(F)F	3.1	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC1033017/ -	Cc1ccc(NS(=O)(=O)c2ccc(Cl)cc2)c(/N=C/c2cc(Cl)cc(Cl)c2O)c1	< 10	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC3106209	O=C(NC(=S)Nc1ccc(O)cc1)c1sc2ccccc2c1Cl	2.7	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC100732450/ 5152985	CC(=O)NC1=CC=C(C=C1)NC(=O)C2=CC=CC=C2NC3=C(C=C(C=C3[N+](=O)[O-])[N+](=O)[O-])[N+](=O)[O-]	< 10	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC2161657/ 2798693	C1=CC=C(C(=C1)NC(=O)NC(=O)C2=C(C=CC=C2F)F)OC3=C(C=C(C=C3)Cl)Cl	< 10	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC1040170/28 23199	COC1=CC=C(C=C1)NC(=S)NC(=O)C2=CN=CC(=C2)C#CC3=CC=CC=C3	3.7	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC6306100/ -	COc1ccc(C(=O)NNC2=CC(=NS(=O)(=O)c3ccccc3)c3ccccc3C2=O)cc1	<10	-	(Du *et al.*, 2000)

-	-	"D46"	Cc1onc(-c2c(Cl)cccc2Cl)c1NC(=O)Nc1ccc(-c2cnns2)cc1	10	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC96928166	CSc1cccc(NC(=O)Nc2sc3ccccc3c2Cl)c1	3	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC1043567/ 2740570	C1=CC(=CC=C1NC(=O)NC2=NC(=CS2)C3=CC(=C(S3)Cl)Cl)Cl	<10 .0	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC1047389/ 2743701	C1=CC(=CC=C1NC(=S)NC(=O)C2=CC(=C(C=C2)OC3=CC=C(C=C3)Cl)[N+](=O)[O-])F	<10 .0	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC1042930/27 26959	C1=CC(=CC=C1C2=NC(=CS2)NC(=O)NC3=CC=C(C=C3)Cl)C(F)(F)F	1.2	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC2161654/ 2798690	C1=CC=C(C(=C1)C(=O)NC(=O)NC2=CC=CC=C2OC3=C(C=C(C=C3)Cl)Cl)Cl	<10 .0	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	"D23"	CCOC(=O)c1ccc(NC(=S)NC(=O)c2ccc(Cl)c(Cl)c2)cc1	1.9	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC1026484/28 08017	CCCC1=C(C=NN1C2=CC=C(C=C2)Cl)NC(=O)NC3=CC=C(C=C3)OC(F)(F)F	2.9	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC2148801/ -	COc1ccccc1Oc1ccc(C(F)(F)F)cc1NC(=O)NC(=O)c1c(F)cccc1F	<10 .0	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC100938233/ 135448110	CC1(CC(=C(C(=NCC2=CC=CC=C2)C1)C(=O)NC3=CC=CC(=C3)C(F)(F)F)O)C	<10 .0	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC96272679/ -	CS(=O)(=O)c1sc(C(=O)NC(=S)Nc2ccc(OC(F)(F)F)cc2)c2ccccc12	6.9	-	(Du *et al.*, 2000)
-	-	ZINC12501249	O=C(N[C@H](Cc1ccccc1)C(=O)N[C@H](Cc1ccccc1)C(=O)CO)OCc1ccccc1	-	0.1	(Huang, Lily; Brinen; Ellman, 2003)
-	-	ZINC13475889	O=C(N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)CS)OCc1ccccc1	-	0.0 04	(Huang, Lily; Brinen; Ellman, 2003)
-	-	ZINC13475890	O=C(N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)N[C@H](CCO)CCc1ccccc1)OCc1ccccc1	-	> 10	(Huang, Lily; Brinen; Ellman, 2003)
-	-	ZINC13475891	O=C(O)C[C@H](CCc1ccccc1)NC(=O)[C@H](Cc1ccccc1)NC(=O)OCc1ccccc1	-	> 10	(Huang, Lily; Brinen; Ellman, 2003)
-	-	ZINC13475892	O=C(N[C@@H](Cc1ccccc1)C(=O)N[C@H](CCS)CCc1ccccc1)OCc1ccccc1	-	> 5	(Huang, Lily; Brinen; Ellman, 2003)
-	-	"Comp3"	NNc1ccnc2cc(Cl)ccc12	61	-	(Andrade *et al.*, 2020)

-	-	"Comp4"	CC(CCN)CNc1ccnc2cc(Cl)ccc12	25	-	(Andrade *et al.*, 2020)
-	-	"Comp5"	Clc1ccc2c(ccnc2c1)N1CCCC1	38	-	(Andrade *et al.*, 2020)
-	-	"Comp6"	CN(C)c1ccnc2cc(Cl)ccc12	55	-	(Andrade *et al.*, 2020)
-	-	"Comp8"	C#CCNCCNc1ccnc2cc(Cl)ccc12	23	-	(Andrade *et al.*, 2020)
-	-	"Comp 3a"	COc1ccc(NC(=O)COC(=O)C(CC(C)C)N2C(=O)C3CC=CCC3C2=O)cc1Cl	2.2	-	(Ferreira et al., 2019)
-	-	"Comp 10h"	COc1ccc(NC(=O)COC(=O)C(N2C(=O)C3CC=CCC3C2=O)C2=CC=CC=C2)cc1Cl	1.4	-	(Ferreira et al., 2019)
-	-	"Comp 3i"	CC(C)CC(N1C(=O)C2CC=CCC2C1=O)C(=O)OCC(=O)NC1=CC=CC=C1	2.1	-	(Ferreira et al., 2019)
-	-	ZINC32627510	Cc1cccc(OCCNC(=O)n2ccnc2)c1	1.0	-	(De Souza *et al.*, 2020)
-	-	"Comp 45"	O=C(NCCOc1ccc2ccccc2c1Br)n1ccnc1	0.12	-	(De Souza *et al.*, 2020)
-	-	MMV687246	CN1CCN(CC1)S(=O)(=O)C1=CC=C(C=C1)C1=CC2=NC=CC(NC3=CC4=NNN=C4C=C3)=C2C=C1	10	-	(Do Valle Moreira *et al.*, 2023)
-	-	MMV687812	CN1CCN(CCCOC2=NC=C(NC3=NC=C(N=C3C(N)=O)C3=CC(F)=C(C=C3)C(F)(F)F)C=N2)CC1	2.6	-	(Do Valle Moreira *et al.*, 2023)
-	-	MMV688179	NC(N)=NC1=CC(Cl)=C(C=C1)C1=CC=C(O1)C1=C(Cl)C=C(C=C1)N=C(N)N	0.53	-	(Do Valle Moreira *et al.*, 2023)
-	-	MMV688362	COC1=C2OC(=CC2=CC(=C1)C1=NCCN1)C1=CC=C(C=C1)C1=NCCN1	2.35	-	(Do Valle Moreira *et al.*, 2023)
-	-	MMV688466	CN1C=CN=C1CNCCS(=O)(=O)C1=CC=CC(NC2=NC=C(C=C2)C2=CC(F)=CC=C2)=C1	25	-	(Do Valle Moreira *et al.*, 2023)
-	-	MMV690028	COC1=C(OCCCCOC2=CC=C(C=C2)C2=NNN=N2)C=C(C=C1)C1=NN(C2CCCCCC2)C(=O)C1(C)C	13	-	(Do Valle Moreira *et al.*, 2023)
-	-	Comp 1	O=C(COc1ccccc1)NCCc1nc2ccccc2[nH]1	10.9	-	(Pauli *et al.*, 2022)
-	-	Comp 25	Cn1c(CCNC(=O)COc2ccccc2)nc2ccccc21	8.6	-	(Pauli *et al.*, 2022)
-	-	Comp 10	O=C(COc1ccc2cc(O)ccc2c1)NCCc1nc2ccccc2[nH]1	3.4	-	(Pauli *et al.*, 2022)
-	-	Comp 11	O=C(COc1ccc2ccc(O)cc2c1)NCCc1nc2ccccc2[nH]1	2.7	-	(Pauli *et al.*, 2022)

-	-	Comp 12	COc1ccc2cc(OCC(=O)NCCc3nc4ccccc4[nH]3)ccc2c1	2.3	-	(Pauli *et al.*, 2022)
-	-	Comp 20	O=C(COc1ccccc1)NCCc1nc2ccccc2n1CCOc1ccccc1	2.04	-	(Pauli *et al.*, 2022)
-	-	Comp 24	O=C(COc1ccccc1)NCCc1nc2ccccc2n1CCCOc1ccccc1	1.43	-	(Pauli *et al.*, 2022)
	121655163	ZINC34754833	O=C(NCc1ccco1)C1Cc2ccccc2CN1	-	4.6	(Santos *et al.*, 2023)
-	-	Comp 22	O=C(NCc1ccco1)[C@H]1Cc2c(F)cccc2C[NH2+]1	-	27.0	(Santos *et al.*, 2023)

Tabela A2 - Conjunto de ligantes cristalográficos da cruzaína avaliados neste estudo e que possuem estruturas cristalográficas disponíveis no PDB

Código PDB	ID do Ligante no PDB	ID utilizado neste trabalho	Resolução (Å)	Classe química	Covalente?	Artigo de referência
1F2C	VS4	1	2	Vinilsulfona	Sim	(Brinen *et al.*, 2000)
1EWO	VSC	2	2.10	Vinilsulfona	Sim	*
1F2A	VS2	3	1,6	Vinilsulfona	Sim	(Brinen *et al.*, 2000)
6UX6	TM8	4	1,94	Vinilsulfona	Sim	*
1F29	VS1	5	2,15	Vinilsulfona	Sim	(Brinen *et al.*, 2000)
2OZ2	D1R	6	1,95	Vinilsulfona	Sim	(Kerr *et al.*, 2009)
4PI3	2V5	7	1,27	Vinilsulfona	Sim	(Jones *et al.*, 2016)
4XUI	2VC	8	2,51	Vinilsulfona	Não	(Jones *et al.*, 2016)
3LXS	4MC	9	1,5	Vinilsulfona	Sim	(Chen, Yen Ting *et al.*, 2010)
3HD3	25B	10	1,75	Vinilsulfona	Sim	(Bryant *et al.*, 2009)
1EWM	RL2	11	2	Epóxido	Sim	*
3I06	QL2	12	1,1	Nitrila	Sim	(Mott *et al.*, 2010)
4QH6	33L	13	3,13	Nitrila	Sim	(Avelar *et al.*, 2015)
7JUJ	GN9	14	2,2	Gallinamida	Sim	(Barbosa Da Silva *et al.*, 2022)
1EWP	0I5	15	1.75	Fluormetilcetona	Sim	*
1AIM	ZYA	16	2	Fluormetilcetona	Sim	(Gillmor; Craik; Fletterick, 1997)
2AIM	ZRA	17	2.20	Fluormetilcetona	Sim	(Gillmor; Craik; Fletterick, 1997)
3IUT	KB2	18	1,2	Fluormetilcetona	Sim	(Brak *et al.*, 2010)
1U9Q	186	19	2,3	alfa-cetoester	Sim	(Choe *et al.*, 2005)
1ME4	T10	20	1,2	Hidroximetilcetona	Não	(Huang, Lily; Brinen; Ellman, 2003)
1ME3	P10	21	1,2	Hidroximetilcetona	Não	(Huang, Lily; Brinen; Ellman, 2003)
3KKU	B95	22	1,28	Benzimidazol	Não	(Ferreira et al., 2010)
4KLB	1RV	23	2,62	Triazol	Não	(Wiggers *et al.*, 2013)

*Artigo de referência no PDB não foi publicados

ANEXO 2

Tabela A3 - Resultados obtidos para a validação dos modelos de cruzipaínas com Molprobity, ERRAT e Q-MEAN

Servidor	Parâmetro	Modelo Avaliado				
		Molde PDB: 1AIM	**CZP2.II.6_ esmo**	**CZP3.II.7_ esmo**	**CZP3.II.9_ non-esmo**	**CZP4.II.7_ non-esmo**
MolProbity	Ramachandran Favored[a] (%)	97,18	98,01	96,92	96,71	97,65
	Ramachandran Outliers[b] (%)	0	0	0	0	0
	Rotamer outliers[c] (%)	2,4	0,65	0,65	0,58	0,58
	C-beta deviation[d] (%)	0,52	0	0	0	0
	Bad Angles[e] (%)	2,59	0,54	0,59	0,04	0,13
	Bad Bonds[f] (%)	0,42	0,67	0,61	0,18	0,24
ERRAT	Quality Factor ERRAT[g]	94,21	92,46	90,42	95,16	93,68
Q-MEAN	Q-MEAN Score[h]	0,04	0,07	-0,25	0,2	0,4

Limiares do molprobity (%): [a] Bom: Favored > 95; Atenção: 98 > Favored ≥ 95; Alerta: Favorecido < 95. [b] Bom: Outlier < 0,05; Atenção: 0,05 < Outlier ≤ 0,05; Alerta: Outlier > 0,05. [c] Bom: Outlier ≤ 0,3; Atenção: 0,3 < Outliers ≤ 1,5; Alerta: Outliers > 1,5. [d] Bom: Outlier = 0; Atenção: 0 < Outliers < 5; Alerta: Outliers ≥ 5. [e] Bom: Outlier < 0,1; Atenção: 0,1 ≤ Ângulos outliers < 0,5; Alerta: Ângulos outliers ≥ 0,5. [f] Ligações outliers < 0,01; Atenção: 0,01 ≤ Ligações outliers < 0,2; Alerta: Ligações outliers ≥ 0,2. [g] Os valores variam de 0 a 100. Valores mais altos indicam menor chance de erros na estrutura. [h] O valor máximo é 1, e valores mais próximos de 1 indicam estruturas mais confiáveis.

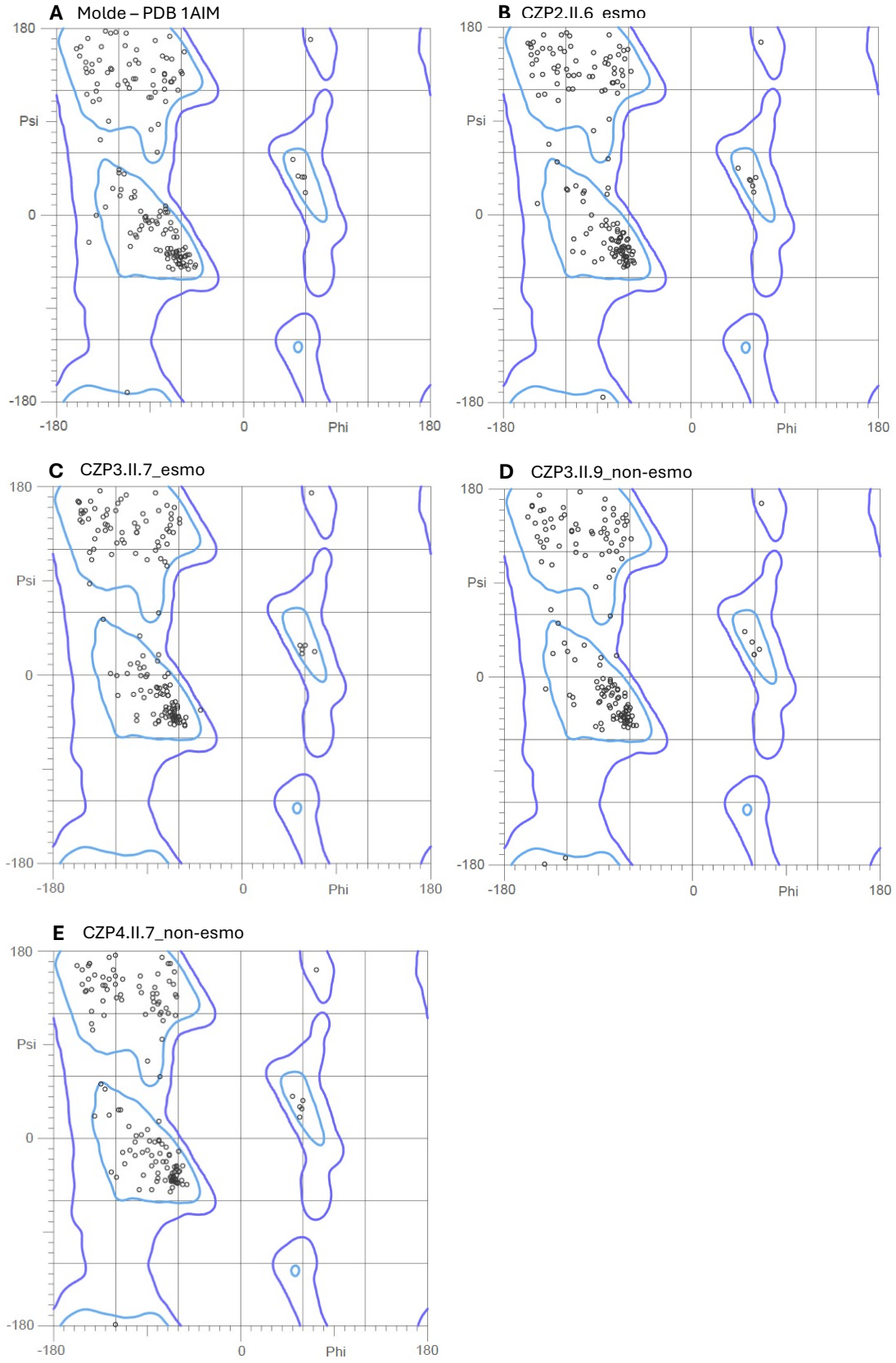


Figura A1 - Gráficos de Ramachandran para os modelos de cruzipaínas. A) Estrutura cristalográfica da cruzaína (czp1) utilizada como molde, PDB 1AIM. B-E) Modelos para as cruzipaínas dos subtipos 2 , 3.7 e 3.9 e 4 . O eixo X mostra os ângulos phi e o eixo Y, os ângulos psi.

ANEXO 3

Simulações de dinâmica molecular

Cruzipaína 2

Vídeos das simulações de dinâmica molecular do composto pertencente ao PDB 1AIM (fluormetilcetona) contra modelo de czp2. A) Réplica 1. B) Réplica 2 e C) Réplica 3

Cruzipaína 3.7

Vídeos das simulações de dinâmica molecular do composto pertencente ao PDB 1AIM (fluormetilcetona) contra modelo de czp3.7. A) Réplica 1. B) Réplica 2 e C) Réplica 3

Cruzipaína 3.9

Vídeos das simulações de dinâmica molecular do composto pertencente ao PDB 1AIM (fluormetilcetona) contra modelo de czp3.9. A) Réplica 1. B) Réplica 2 e C) Réplica 3

Cruzipaína 4

Vídeos das simulações de dinâmica molecular do composto pertencente ao PDB 1AIM (fluormetilcetona) contra modelo de czp4. A) Réplica 1. B) Réplica 2 e C) Réplica 3

APÊNDICE

Outros projetos desenvolvidos durante o mestrado

A) Participação no Programa Next Generation Scientist 2024

Foi um dos 18 selecionados globalmente (de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento) para integrar o programa *Next Generation Scientist* (NGS), ofertado pela Novartis Pharma AG e pela Universidade de Basel. Durante três meses, integrou o departamento de Protein Sciences da Novartis, na Suíça, desenvolvendo atividades de pesquisa sob a supervisão do Dr. Benedikt Goretzki. O projeto tinha como objetivo identificar ligantes para a proteína GABARAP, visando o desenvolvimento de moléculas bifuncionais para promover a degradação de proteínas-alvo por autofagia.

Além disso, participou de treinamentos sobre comunicação e liderança, bem como seminários nas áreas de: descoberta de fármacos, ensaios clínicos, segurança de medicamentos, sistemas de saúde e ciências regulatórias. Ao todo, foram 640 horas dedicadas ao treinamento e ao desenvolvimento do projeto de pesquisa.

O trabalho desenvolvido foi apresentado na seção final do programa no formato de pôster

B) Capítulo de Livro

Foi coautor de um capítulo de livro intitulado *Molecular Modeling Strategies in Drug Design, Development, and Discovery Targeting Proteases*. O capítulo discute medicamentos comercializados que têm como alvo proteases para três doenças virais e para o diabetes tipo 2, destacando a importância das ferramentas computacionais e apresentando diversas estratégias utilizadas, com ênfase na abordagem baseada em estrutura. (*structure-based drug design* (SBDD))

C) Artigos Publicados

CERUTTI, Juan Pablo; **DINIZ, Lucas Abreu**; SANTOS, Viviane Corrêa; VILCHEZ LARREA, Salomé Catalina; ALONSO, Guillermo Daniel; FERREIRA, Rafaela Salgado; QUEVEDO, Mario Alfredo; DEHAEN, Wim. *Discovery of a Potent Triazole-Based Reversible Targeted Covalent Inhibitor of Cruzipain*. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, p. 72-79, 2024.

CERUTTI, Juan Pablo; **DINIZ, Lucas Abreu**; SANTOS, Viviane Corrêa; VILCHEZ LARREA, Salomé Catalina; ALONSO, Guillermo Daniel; FERREIRA, Rafaela Salgado; DEHAEN, Wim; QUEVEDO, Mario Alfredo. *Structure-Aided Computational Design of Triazole-Based Targeted Covalent Inhibitors of Cruzipain*. *MOLECULES*, v. 29, p. 4224, 2024.

CERUTTI, Juan Pablo; **DINIZ, Lucas Abreu**; CORRÊA SANTOS, Viviane; VILCHEZ LARREA, Salomé Catalina; ALONSO, Guillermo Daniel; FERREIRA, Rafaela Salgado; DEHAEN, Wim; QUEVEDO, Mario Alfredo. *Thiosulfonate-Based Targeted Covalent Cruzipain Inhibitors with Enhanced Bioactivity Translation for Antichagasic Therapy*. *ACS Medicinal Chemistry Letters*.

Rahamah Sheu-Idrees; Gabriel Vitor de Lima Marques; Pedro Augusto Lemos Santana; **DINIZ, L. A.**; Daniela de Melo Resende; Saidi Odoma; Omodamiro Olorunshola; Rafaela Salgado Ferreira; Silvane Maria Fonseca Murta; Vinícius Gonçalves Maltarollo; Renata Barbosa de Oliveira. *Investigation of the Activity of 4-Aminoquinolines as Cysteine Protease Inhibitors with Application in the Treatment of Chagas Disease*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*.

Em todos esses trabalhos, participou realizando ensaios enzimáticos de compostos contra a cruzaína. Os ensaios realizados incluíram a determinação de valores de IC50, avaliação da inibição por agregação, determinação de mecanismo de inibição e testes para determinar a irreversibilidade ou reversibilidade dos inibidores.

D) Apresentações em Congresso

DINIZ, Lucas Abreu; DO VALLE MOREIRA, Thales; MARTINS, Luan Carvalho; BERNARDES, Talita Cristina Diniz; Oliveira, R. B.; FERREIRA, R. S. *Discovery and Characterization of Promising Cruzain Inhibitors through Pathogen Box Screening*. Apresentação em Congresso, 2023.

Apresentou resultados dos ensaios enzimáticos que realizou durante a iniciação científica relacionados ao trabalho publicado como:

DO VALLE MOREIRA, Thales; MARTINS, Luan Carvalho; **DINIZ, Lucas Abreu**; BERNARDES, Talita Cristina Diniz; DE OLIVEIRA, Renata Barbosa; FERREIRA, Rafaela Salgado. *Screening the Pathogen Box to Discover and Characterize New Cruzain and TbrCatL Inhibitors*. *PATHOGENS*, v. 12, p. 251, 2023.