

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

OBTENÇÃO DE NANOANTICORPOS E SÍNTESE DE
COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS DERIVADOS DE
TIOSSEMICARBAZONA

LORENA BLAU

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA

OBTENÇÃO DE NANOANTICORPOS E SÍNTESE DE COMPOSTOS
ANTICHAGÁSICOS DERIVADOS DE TIOSSEMICARBAZONA

Lorena Blau

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Chung Man Chin

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

B645o Blau, Lorena
Obtenção de nanoanticorpos e síntese de compostos antichagásicos derivados de tiossemicarbazona / Lorena Blau. – Araraquara, 2009.
151 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Chung Man Chin

1.Doença de Chagas. 2.Anticorpos monoclonais. 3.Tiossemicarbazona. 4.Química farmacêutica. 5.Pró-fármaco. I.Chung Man Chin, orient..
II.Título.

CDD 615.19

CAPES: 40300005

Que eu continue a acreditar no outro mesmo sabendo de alguns valores tão estranhos que permeiam o mundo!

Que eu continue otimista... mesmo sabendo que o futuro que nos espera nem sempre é tão alegre!

Que eu continue com a vontade de viver mesmo sabendo que a vida é em muitos momentos, uma lição difícil de ser aprendida!

Que eu permaneça com a vontade de ter grandes amigos, mesmo sabendo que com as voltas do mundo, eles vão indo embora de nossas vidas!

Que eu realmente sempre a vontade de ajudar as pessoas, mesmo sabendo que muitas delas são incapazes de ver, sentir, entender ou utilizar esta ajuda!

Que eu mantenha meu equilíbrio, mesmo sabendo que os desafios são inúmeros ao longo do caminho!

Que eu exteriorize a vontade de amar, entendendo que amar não é sentimento de posse... É sentimento de doação!

Que eu sustente a luz e o brilho no olhar, mesmo sabendo que muitas coisas que vejo no mundo, escurecem meus olhos!

Que eu retroalimente minha garra, mesmo sabendo que a derrota e a perda são ingredientes tão fortes quanto o Sucesso e a Alegria!

Que eu atenda sempre mais a minha intuição, que sinaliza o que de mais autêntico possuo! Que eu pratique sempre mais o sentimento de justiça, mesmo em meio à turbulência dos interesses!

Que eu não perca o meu forte abraço e o distribua sempre; que eu perpetue a Beleza e o Brilho de ver, mesmo sabendo que as lágrimas também brotam dos meus olhos!

E que eu manifeste o amor por minha família, mesmo sabendo que ela muitas vezes me exige muito para manter sua harmonia!

Que eu acalente a vontade de ser grande, mesmo sabendo que minha parcela de contribuição no mundo é pequena!

E, acima de tudo... Que eu lembre sempre que todos nós fazemos parte desta maravilhosa teia chamada Vida, criada por Alguém bem superior a todos nós!

E que as grandes mudanças não ocorrem por grandes feitos de alguns e, sim, nas pequenas parcelas cotidianas de todos nós!

Pequena Parcela Crystal, 2006

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Harry Blau e Inayá Rosa Borges, pelo enorme esforço para proporcionar as filhas uma educação de qualidade, sem a qual não seria possível a realização deste projeto.

Ao meu amigo, colega e companheiro Renato, pela amizade, amor, contribuição ao trabalho e paciência infinita em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Chung Man Chin pela orientação, amizade nos momentos mais difíceis e pela confiança depositada em mim e ao meu trabalho, e por ter me incentivado a dar os primeiros passos na pesquisa científica.

À Maria do Rosário Guerra Araújo pela paciência, dedicação e pelos seus valiosos ensinamentos e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Capes, pelo suporte financeiro para execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Serge Muyldermans, Inge, Jan e Reza da Vrije Universiteit Brussels pela paciência e ensinamentos sem os quais seria impossível a realização deste trabalho.

Aos Professores Doutores Nobuko Yoshida, Sergio Schenkman e ao Dr. Rafael Miazawa Martins da Unifesp pela inestimável colaboração a este trabalho, sem eles também não seria possível sua realização.

À Prof. Dra. Regina Maria Barretto Cicarelli, a Mestre Gabriela Duó Passarine e a Mestre Priscila Longhin Bosquesi pela grandiosa colaboração para realização dos ensaios biológicos de grande importância a este trabalho.

Às Professoras Doutoradas, Adélia Emília de Almeida, Carlota Oliveira Rangel Yagui, Regina Maria Barretto Cicarelli e Veni Maria Andres Felli, integrantes da banca de defesa pelas valorosas contribuições dadas a este trabalho.

Aos funcionários Luiz Eduardo dos Santos (Dudu), Matheus Scontri e Osmar Redondo por toda ajuda e pelo ambiente descontraído no laboratório.

Aos amigos de pós-graduação, Jean, Priscila, Zé Ricardo e Ednir e aos estagiários, Diego, Thales, Itzia, Paulo, Richard, Rafael, entre outros pela convivência e colaboração.

Ao André Luís por me ajudar a ser mais serena e paciente, dando-me força nos momentos mais difíceis ...

Aos pais de meu querido companheiro, Antonio Carlos Menegon, Nádia Farina Menegon e de sua avó Maria Cano Farina por sua amizade, dedicação e presença nos momentos difíceis e também nos felizes.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
CAPÍTULO 1 - SÍNTESE DE COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS	
DERIVADOS DE TIOSSEMICARBAZONA	11
1.1. INTRODUÇÃO	12
1.1.1. Parasito	16
1.1.2. Ciclo Biológico	18
1.1.3. <i>T. cruzi</i> e sua Interferência no Sistema Imunológico do Hospedeiro	20
1.1.4. Transialidase	21
1.1.5. Cruzipaína	25
1.1.6. Mutagenicidade e Genotoxicidade do Grupo Nitro	31
1.2. OBJETIVO	34
1.3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
1.3.1. Materiais	35
1.3.1.1. Síntese dos Compostos Derivados de Tiossemicarbazona	35
1.3.1.2. Atividade Tripanocida	35
1.3.1.3. Ensaio de Mutagenicidade – Teste de Micronúcleo	35
1.3.2. Métodos	36
1.3.2.1. Síntese dos Derivados de Tiossemicarbazona	36
1.3.2.2. Teste <i>In Vitro</i> de Atividade Tripanocida	41
1.3.2.3. Ensaio de Mutagenicidade - Teste do Micronúcleo	41
1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
1.4.1. Mecanismo de formação dos derivados de tiossemicarbazonas	42
1.4.2. Mecanismo de Formação e Síntese dos Compostos Nitrados Derivados de Tiossemicarbazona	43

1.4.3. Caracterização Espectrofotométrica dos Compostos Obtidos	46
1.4.4. Teste <i>In Vitro</i> de Atividade Tripanocida	51
1.4.5. Ensaio de mutagenicidade - Teste do micronúcleo	54
1.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	60
CAPÍTULO 2 - OBTENÇÃO DE NANOANTICORPOS	61
2.1. INTRODUÇÃO	62
2.1.1. Utilização de Anticorpos na Terapêutica	62
2.1.2. Anticorpo Monoclonal	62
2.1.3. Sistema Conjugado Fármaco-Anticorpo	66
2.1.4. Anticorpos Biespecíficos	68
2.1.5. Nanoanticorpos de Camelídeos VHH	69
2.2. OBJETIVO	70
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS	71
2.3.1 Materiais	71
2.3.1.1. Obtenção de Nanoanticorpos Anti-Transialidase e Anti-J-18	71
2.3.2. Métodos	72
2.3.2.1. Obtenção de Nanoanticorpos Anti-Transialidase e Anti-J-18	72
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
2.4.1. Obtenção de Nanoanticorpos Anti-Transialidase e Anti-J-18	75
2.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
GLOSSÁRIO	98
APÊNDICE A – Espectros de infravermelho	100
APÊNDICE B – Espectros de RMN	106

APÊNDICE C – Sequenciamento de aminoácidos	121
ANEXO A – Procedimentos experimentais para síntese de compostos antichagásicos	124
A1. Procedimentos Sintéticos	124
A1.1. Síntese do composto 4-aminoacetofenona tiossemicarbazona (TS-1)	124
A1.2. Síntese do composto 3-aminoacetofenona tiossemicarbazona (TS-2)	124
A1.3. Síntese do composto 2-amino-1-feniletan-1-ona tiossemicarbazona (TS-3)	125
A1.4. Síntese do composto 4-amino-3-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-4)	125
A1.5. Síntese do composto 3-amino-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-5)	127
A1.6. Síntese do composto 2-amino-1-(3-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona (TS-6)	128
A1.7. Síntese do composto acetofenona tiossemicarbazona (TS-7)	130
A1.8. Síntese do composto 3-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-8)	130
A1.9. Síntese do composto hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS-9)	131
A1.10. Síntese do composto hemissuccinato de 2-hidroxi-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS-10)	133
A2. Teste <i>In Vitro</i> de Atividade Tripanocida	134
A3. Ensaio de Mutagenicidade - Teste do Micronúcleo	136
ANEXO B – Procedimentos experimentais para obtenção de nanoanticorpos anti-transialidase e anti-J-18	138
B1. Extração dos linfócitos	138
B2. Preparação do cDNA	139

B3. Construção da biblioteca de VHH no vetor pHEN4	139
B4. Seleção de nanoanticorpos específicos aos antígenos TS e J-18 (panning), realização da 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a etapa de seleção	141
B5. Avaliação da 2 ^a e 3 ^a etapa de seleção de nanoanticorpos específicos pelos antígenos J-18 e TS	146
B6. Verificação por Elisa do enriquecimento das seleções da 1 ^a , 2 ^a e 3 ^a etapa de seleção de nanoanticorpos específicos pelos Antígenos J-18 e TS	147
B7. Inserção dos genes do VHH no vetor pBAD/gIII	148
B8. Digestão dos VHH e vetor pBAD/gIII e reação de ligação	150
B9. Transformação em LMG194 e expressão de VHH	150

RESUMO

A doença de Chagas ou Tripanossomíase americana é ainda um dos maiores problemas endêmicos na América Latina desde sua descoberta 100 anos atrás. Em 2006, havia aproximadamente 7,6 milhões de casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* nos 21 países latino americanos. Cerca de 90 milhões de pessoas estão sobre o risco de contrair a infecção. O número de mortes e novos casos atribuídos a essa doença são respectivamente 21.000 e 200.000 no ano de 2000. Dois fármacos são usados particularmente para tratar esta doença, nifurtimox e benznidazol que são ativos somente na fase aguda da doença. No Brasil, somente benznidazol é disponível no mercado, por causa da resistência do nifurtimox às cepas de *T. cruzi*. Ambos os fármacos causam efeitos adversos graves que incluem polineuropatia periférica, agranulocitose e trombocitopenia púrpura.

Embora o papel exato do sistema imune na patogenia não é totalmente entendido, é aceito que o sistema imune tenha um papel importante na proteção da infecção parasitária. Antígenos produzidos por *T. cruzi* afetam a função celular e induzem uma resposta caótica no hospedeiro, como a transialidase (TS) que é essencial para sobrevivência do parasita. TS é uma enzima envolvida na invasão de células hospedeiras mamíferas, na proteção contra componentes do sistema complemento e induz apoptose severa nas células do sistema imune, e que a administração de anticorpos é capaz de neutralizar esta enzima. Outro antígeno, J-18, um derivado recombinante da glicoproteína gp82, é capaz de se ligar à mucosa gástrica e isto é crucial para o estabelecimento da infecção oral. Então, um anticorpo contra esta glicoproteína poderia ser útil para inibir a invasão na mucosa gástrica.

Cruzipaína é outra enzima importante do *T. cruzi* e suas funções parecem ser participar da nutrição, mecanismos de defesa e replicação do parasita intracelular. Enquanto não existem fortes inibidores contra TS, compostos tiossemicarzônicos possuem uma atividade de destaque contra cruzipaína.

Os objetivos deste trabalho foram sintetizar compostos tiossemicarbazônicos e testar suas atividades, genotoxicidade e produzir nanoanticorpos (anticorpos muito pequenos derivados de camélídeos) contra TS e J-18 para propósitos terapêuticos.

Neste trabalho, 12 compostos foram sintetizados, sendo que os três mais ativos contra *T. cruzi* epimastigotas mostraram não serem genotóxicos em modelo experimental em camundongos. A produção de nanoanticorpos ativos contra TS e J-18 também foi realizada, sendo possível obter clones expressantes destes nanoanticorpos.

ABSTRACT

Chagas disease or American trypanosomiasis is still one of the major endemic problems in Latin America since its discovery 100 years ago. In 2006, there were approximately 7.6 million cases of *Trypanosoma cruzi* infection in 21 Latin American countries. Around 90 million people are at risk of contracting the infection. The number of deaths and new cases attributed to this disease are respectively 21,000 and 200,000 in the year 2000. Two drugs are particularly used to treat this disease; nifurtimox and benznidazol are active only in its acute phase. In Brazil, just benznidazol is available in the market, because nifurtimox resistant to *T. cruzi* strains. Both drugs cause severe side-effects including peripheral sensitive polyneuropathy, agranulocytosis and thrombocytopenic purpura.

Although the exact role of the host immune system in the pathogenesis is not still fully understood, it is accepted that the immune system plays an important role in protection from parasitic infection. Antigen derivatives from *T. cruzi* affect cellular function and induce chaotic immune system host response, like *trans*-sialidase (TS) being essential for the parasite survival. TS is an enzyme involved in the invasion of mammalian host cells, in the protection against components of complement system and induces severe apoptose in cells of the immune system, and that antibodies administration is able to neutralize this enzyme. Another antigen, J-18, a recombinant glycoprotein gp82 derivative, is able to bind to gastric mucin and this is crucial for the establishment of *T. cruzi* infection by oral route. Then, an antibody against this glycoprotein could be useful to inhibit the gastric mucin invasion.

Cruzain is another important enzyme of *T. cruzi* and its functions seem to participate in nutrition, defense host mechanisms and replication of intracellular parasite. While there are no strong inhibitors against TS, thio semicarbazone compounds display remarkable activity against cruzain.

The aims of this work were to synthesize thio semicarbazone compounds and test their activities, genotoxicity and to produce nanobodies (very small antibodies *Camelidae* derivatives) against TS and J-18 for therapeutic purposes.

In this work 12 compounds were synthesized, being that the three more active against *T. cruzi* epimastigotes show not to be genotoxic in experimental mice model. The production of active nanobodies against TS and J-18 antigens was also done, allowing getting the nanobodies' expressive clones.

CAPÍTULO 1

SÍNTESE DE COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS DERIVADOS DE TIOSEMICARBAZONA

1.1. INTRODUÇÃO

No começo do último século, Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, membro do Instituto Manguinhos, no Rio de Janeiro, após um ano de exaustivo e bem sucedido trabalho, descobriu em Minas Gerais, o agente etiológico, o vetor, os sinais clínicos da doença e também os mecanismos de transmissão da doença. Também descreveu a morfologia do parasita, seu ciclo de vida no inseto e no hospedeiro mamífero, e revelou os diferentes estágios clínicos e manifestações da doença. Embora ele tenha descrito vários aspectos da doença, a cura ou um tratamento adequado permanecem como objetivos a serem alcançados após exatos um século de sua descoberta (GOLDBAUM; BARRETO, 2008).

A Tripanossomíase americana ou doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A infecção humana estende-se através da América do Norte, Central e Sul, do México a Argentina e Chile afetando 21 países (SCHMUNIS, 2007).

A maioria das infecções humanas ocorridas no México ainda ocorre quando pele ou mucosas entram em contato com fezes e urina de insetos hematófagos de espécies triatomíneas infectados por *T. cruzi*. Contudo avanços significativos na interrupção da transmissão pelo vetor *Triatoma infestans* no Uruguai em 1997, Chile em 1999 e no Brasil em 2006 foram atestadas pela Organização Panamericana da Saúde (SCHMUNIS, 2007; FERREIRA; SILVA, 2006).

A transfusão sanguínea já foi considerada a segunda forma mais comum de transmissão do *T. cruzi*. Felizmente, somente uma fração de indivíduos que recebe sangue contaminado desenvolve a doença, as taxas variavam de 12 a 20% na Argentina, Brasil e Chile e até 48% no México (SCHMUNIS, 1991). No entanto, esta forma de contaminação vem diminuindo nos últimos 15 anos, devido a implementado políticas para prevenir a transmissão da doença por transfusão na maioria dos países latino-americanos. Oito países em 2004 monitoravam 100% o sangue dos doadores e mais quatro países monitoravam uma porcentagem $\geq 99\%$ (SCHMUNIS, 2007).

A transmissão congênita varia de 1 a 12% entre os países do cone sul da América do Sul (SCHMUNIS, 2007). Adicionalmente, *T. cruzi* pode ser transmitido por transplante de órgãos, por acidentes laboratoriais e hospitalares e por aleitamento materno.

A transmissão oral vem ganhando importância no Brasil e também em outros países, recentemente foi confirmada esta forma de transmissão na Venezuela pela ingestão de bebidas (TEIXEIRA; et al., 2006; RODRIGUEZ-MORALES, 2008). De acordo com Coura, a infecção oral é hoje a mais importante forma de transmissão da doença devido o controle da proliferação do inseto e um maior controle nos bancos de sangue (COURA, 2007). Ela ocorre pelo consumo de alimentos contaminados com o triatomíneo ou por suas fezes e pelo consumo de carne crua de um hospedeiro infectado. O primeiro relato da doença transmitida por esta via ocorreu em 1965 através do consumo de cana-de-açúcar (NÓBREGA; et al., 2009).

Durante 1968 a 2005, um total de 437 casos de doença de chagas aguda foram constatados na região amazônica. Entre janeiro a novembro de 2006, um total de 178 casos da doença aguda ocorreu no estado do Pará devido ao consumo de açaí (NÓBREGA; et al., 2009).

Os gambás (*Didelphis marsupialis*) possuem um papel importante, pois são reservatórios das formas metacíclicas infectantes que podem ser encontradas no lúmen de sua glândula anal. Os alimentos ingeridos pelos seres humanos podem ser contaminados pela secreção desta glândula. Em 1986, muitas pessoas adquiriram a doença após ingestão de caldo-de-cana e nas proximidades um elevado número de gambás infectados foi encontrado (DEANE; et al., 1984; SHIKANAI-YASUDA; et al., 1991).

Apesar da significativa diminuição na infecção e mortalidade através de iniciativas de controle dos bancos de sangue e do vetor *Triatoma infestans*, tem sido observado outros vetores nas cidades da América Central e do Sul na última década. No Brasil, das 44 espécies identificadas, as mais importantes pelo seu grau de contágio, ou seja, espécies primárias são: *Triatoma infestans*, *T. rubrofasciata*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus*

megistus. São consideradas espécies secundárias: *Rhodnius neglectus*, *R. nasutus*, *Triatoma rubrovaria* e *T. vitticeps* (TARTAROTTI; et al., 2004).

Estimativas recentes sugerem que aproximadamente 90 milhões de indivíduos permaneçam sob o risco de contrair a doença (SCHMUNIS, 2007). Em países como o México, a deterioração econômica tem levado ao aumento da incidência de Chagas (SCHMUNIS, 2007; LEVY; et al., 2006). Não devemos nos esquecer das mudanças climáticas no mundo. Baseada em fatores ambientais e sociais, em conhecimentos médicos e na análise de três espécies de triatomíneos que abrigam o *T. cruzi* e que exibem características para domesticação, um estudo de Click *et al.* (2008) indica que há um risco potencial desta doença emergir nos Estados Unidos; uma análise do limiar de temperatura mínima para o aumento da atividade destes triatomíneos demonstra que existe um alto risco potencial para grande parte da região sul e parte da região central dos EUA, baseado nas previsões da temperatura para 2030.

Resultados importantes têm sido obtidos em poucas décadas, mas a situação difere grandemente em diferentes regiões. Reduções significativas têm sido observadas no número de casos agudos e na população de triatomíneos intradomiciliares em países como Brasil. Dados estimados de mortes anuais decresceram de 45000 em 1990 a 12500 em 2006. O número estimado de indivíduos infectados é de 15 milhões e a incidência anual de novos casos durante estes dezesseis anos caiu de 700 mil para 41 mil de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008).

Entretanto, de acordo com Schmunis *et al.*(2007), o número de indivíduos infectados no ano de 2006 era de 7,6 milhões e a incidência de novos casos no ano de 2000 foi de aproximadamente 200 mil e o número de mortes foi de 21 mil casos demonstrando uma grande divergência nos dados, retratando a falta de dados epidemiológicos confiáveis.

Existem apenas dois fármacos disponíveis no mercado: nifurtimox e benznidazol, ambos ativos para a fase aguda da doença e apresentam significativos efeitos adversos incluindo anorexia, vômito, diarreia, polineuropatia periférica, agranulocitose e trombocitopenia púrpura, que em

alguns casos levam a descontinuação do tratamento (URBINA; DO CAMPO, 2003; CHAMOND; 2002).

Há dois estágios desta doença em humanos: a fase aguda, que aparece rapidamente após a infecção e é caracterizada por febre, linfadenopatia e hepato-esplenomegalia e a fase crônica aparece após um período de latência que pode durar anos. As lesões desta fase afetam irreversivelmente órgãos internos como o coração, esôfago, cólon e sistema nervoso periférico (LANA; TAFURI, 1991). Após muitos anos de um período assintomático, 27% dos infectados desenvolvem sintomas cardíacos os quais podem levar a morte súbita, 6% desenvolvem distúrbios digestivos (megacólon e megaesôfago) e 3% apresentam distúrbios neurológicos (meningoencefalite aguda multifocal) (CIMERMAN; CIMERMAN, 2003; WHO, 2003).

Quando a porta de entrada dos tripanossomas é a conjuntiva ocular, pode ocorrer um edema bipalpebral, unilateral, denominado "sinal de Romaña-Mazza" (figura 1.1). Quando o parasita penetra por outros locais da superfície corporal, a lesão produzida recebe o nome de "chagoma de inoculação".



Figura 1.1: Sinal de Romaña-Mazza.

(imagem obtida em: < <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>>)

Com frequência, a fase aguda passa despercebida, pois seus sintomas podem confundir-se com os de diversas outras infecções. Entretanto, em alguns pacientes, principalmente crianças ou indivíduos imunodeficientes, quadros meníngeos graves e de insuficiência cardíaca podem estar associados e ocorrer óbito.

O risco de infecção está diretamente associado a fatores sócio-econômicos, pois o vetor que transmite a doença encontra um favorável habitat nas frestas de casas simples rurais denominadas “pau-a-pique” (figura 1.2).



Figura 1.2: Casa de pau-a-pique.

(imagem obtida no site: <<http://www.sucen.sp.gov.br>>)

1.1.1. Parasito

Taxinomicamente, o parasito causador da doença de Chagas pertence ao sub-reino Protozoa, filo Sarmastigophora, da classe Mastigophara, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi* (LANA; TAFURI, 1991).

Possui um flagelo, um núcleo e a mitocôndria que abriga em seu interior os cinetoplastídeos correspondentes a 20 a 30% do total do DNA do parasito. A presença de cinetoplastídeo, que pode ser visualizada por microscópio óptico, conduz ao diagnóstico de tripanossomíase ou leishmaniose (CIMERMAN; CIMERMAN, 2003). Estudos utilizando microscopia eletrônica mostram que as

moléculas de DNA de cinetoplastídeo são organizadas formando macro e microcírculos. Há evidências de que os microcírculos transcrevem pequenas proteínas, das quais a existência e importância ainda não foram estabelecidas. Apesar de que existam evidências que o DNA destes micronúcleos possam se transferir para o genoma de hospedeiros mamíferos, uma sequência truncada de DNA de cinetoplastídeo foi encontrada no genoma de um macaco babuíno infectado por *T. cruzi*. Os macrocírculos são responsáveis pela codificação de enzimas que participam do metabolismo do parasita (DE SOUZA, 2002, TEIXEIRA; et al., 2006).

São reconhecidas três formas evolutivas do *T. cruzi* (figura 1.3): a amastigota ou forma de reprodução em mamíferos, intracelular, de forma ovóide medindo 3 a 5 μm e pode ser encontrada em grande número, intracelularmente, como consequência de sua divisão binária. Outra forma evolutiva, que se encontra no sangue circulante do vertebrado e também no intestino do vetor, é a tripomastigota, com flagelo medindo entre 15 e 21 μm de comprimento e 3 a 5 μm de largura. A última forma, a epimastigota, é exclusiva do vetor em seu intestino (CIMERMAN; CIMERMAN, 2003).

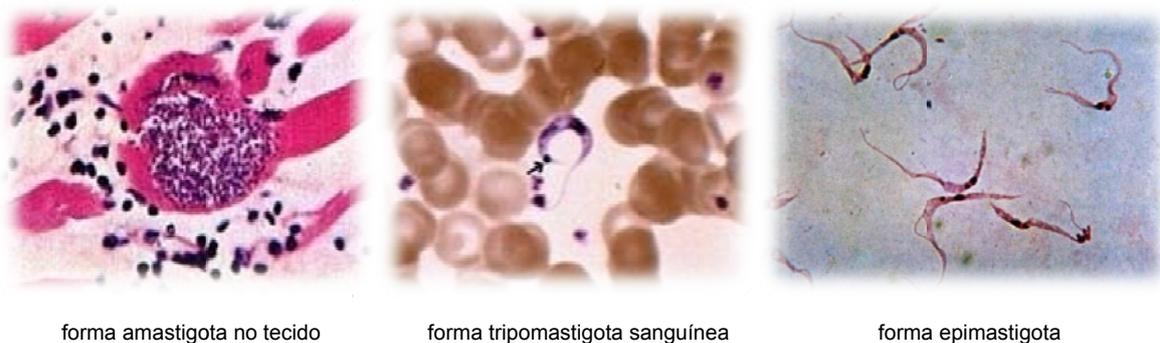


Figura 1.3: Representação das formas evolutivas do *T. cruzi*.
(imagem obtida em: <<http://www.parasitologia.com/protzooses.htm>>)

1.1.2. Ciclo Biológico

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* (figura 1.4) transcorre em dois hospedeiros diferentes (URBINA, 1999; CIMERMAN; CIMERMAN, 2003). No vetor, o parasita prolifera no lúmen do trato gastrointestinal como epimastigota (forma não infectante), a qual se diferencia no reto, devido ao *stress* nutricional, em tripomastigota metacíclico (forma infectante).

A transmissão vetorial no mamífero inicia-se quando o inseto vetor, após o repasto sanguíneo, defeca liberando as formas tripomastigotas metacíclicas. Essas formas penetram no hospedeiro vertebrado pela lesão da picada ou diretamente pelas mucosas, onde invadem as células das camadas subjacentes.

Estas formas proliferativas escapam do sistema imune e invadem uma infinidade de tipos celulares, incluindo músculos, células nervosas do coração e do trato gastrointestinal. Depois da invasão, os parasitas prontamente escapam do vacúolo fagossômico e se diferenciam em amastigotas, perdendo o flagelo e a membrana ondulante, forma sob a qual se reproduzem (URBINA, 1999; CIMERMAN; CIMERMAN, 2003).

Permanecem em fase lag (sem multiplicação) por, aproximadamente, 30 horas, após a qual, por divisão binária, cada amastigota se divide em dois, a cada 14 horas. Podem ser observados até 9 ciclos de divisão sucessivos, ou seja, cada parasito pode gerar 512 parasitos em seis dias e meio, abarrotando o citoplasma da célula parasitada e levando a sua ruptura. Antes da saída da célula, os amastigotas se transformam em tripomastigotas. Os parasitos, então, readquirem o flagelo e a membrana ondulante, tornando-se tripomastigotas e disseminam-se para o restante do organismo pela circulação sanguínea. Estes ciclos ocorrem continuamente no hospedeiro infectado, embora com frequência bem menor na fase crônica da infecção (URBINA, 1999; CIMERMAN; CIMERMAN, 2003).

Estes parasitos circulantes podem ser ingeridos durante o repasto sanguíneo dos triatomíneos. Desta forma, insetos não contaminados ingerem

as formas tripomastigotas, que se transformam no intestino do inseto em epimastigotas. Estas se multiplicam logo após, em ciclos sucessivos, alcançando o intestino posterior do vetor, onde a maioria se transforma novamente em tripomastigota metacíclico infectante, que pode contaminar mamíferos não infectados, reiniciando o ciclo evolutivo (URBINA, 1999; CIMERMAN; CIMERMAN, 2003).

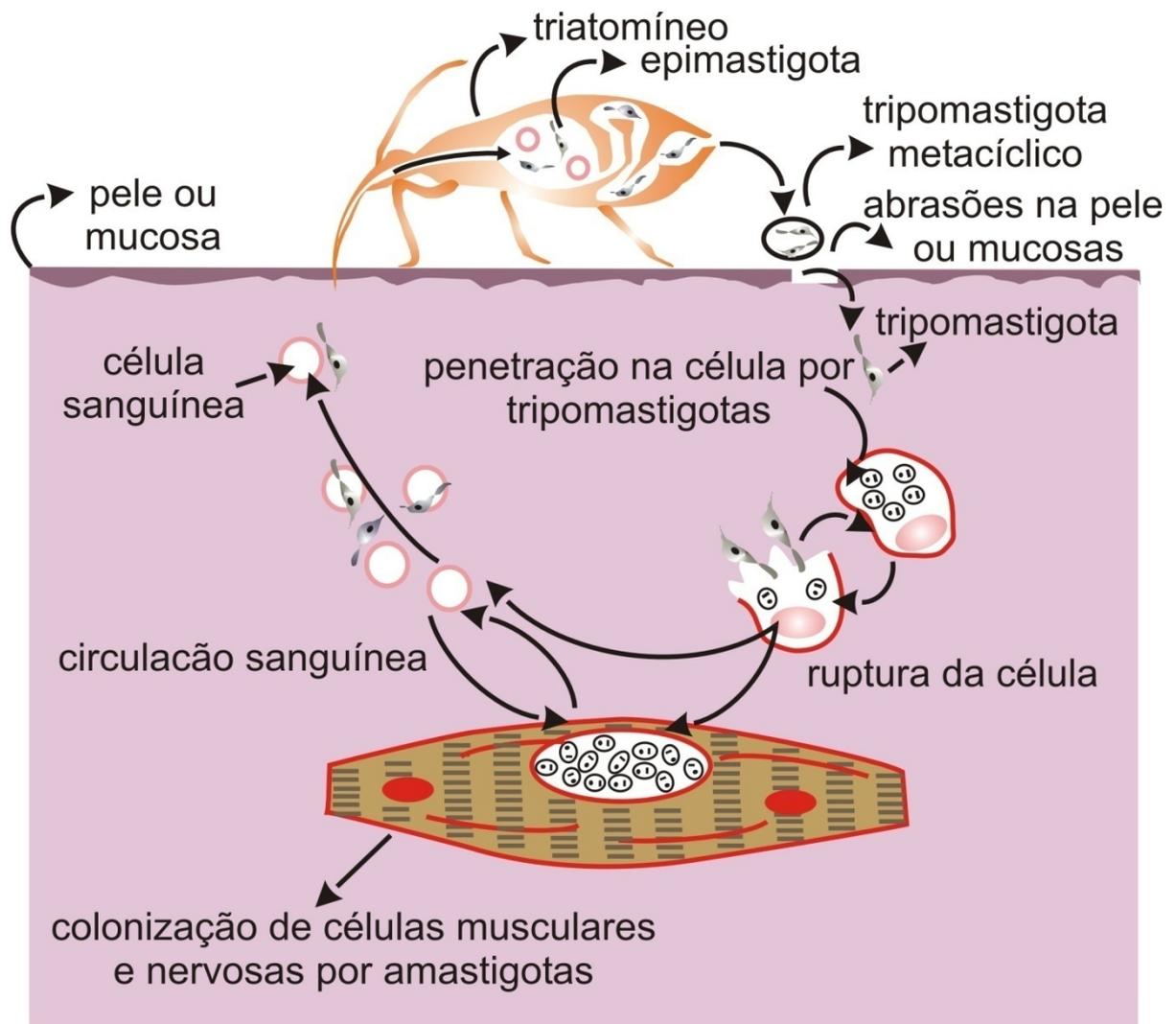


Figura 1.4: Ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

(imagem obtida em: <<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>>)

1.1.3. *T. cruzi* e sua Interferência no Sistema Imunológico do Hospedeiro

O exato papel do sistema imune do hospedeiro na patogênese de infecções parasitárias ainda não está completamente entendido, mas existem evidências experimentais de que a deficiência ou defeito nas respostas imune celular e/ou humoral para *T. cruzi* contribui para o progresso da doença de Chagas e que moléculas biossintetizadas por *T. cruzi* afetam a função celular e contribuem para a desorganização da resposta imune do hospedeiro (OUAISSI; OUAISSI, 2005).

Glicoinositolfosfolipídeos (GIPL) estão presentes na superfície celular do *T. cruzi* nas formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos e bloqueiam a resposta das células T induzidas por diferentes ativantes policlonais, devido uma porção ceramida presente na molécula. GIPLs purificados de *T. cruzi* inibiram *in vitro* a proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ induzidas por antígenos de bactérias e anticorpos anti-TCR e CD3. A inibição levou à perda da responsividade do IL-2, com inibição da expressão de CD25. GIPLs também estão envolvidos na diminuição de antígenos de superfície de células dendríticas humanas tais como, CD80, CD86, HLA-DR, CD40 e CD57 que são importantes na ativação de células T (DOS REIS; et al., 2002).

Rodriguez *et al.* (2007) verificaram que infecções de *T. cruzi* induzem uma massiva perda de células B imaturas na medula óssea. Células B imaturas da medula óssea sofrem apoptose após células mielóides CD11b⁺ infectadas por *T. cruzi* secretarem um produto oriundo da via ciclooxigenase. Vários clones de célula B muito ativados por ativação policlonal no baço de camundongos infectados promovem apoptose de células B devido ao aumento da expressão e interação de Fas e FasL e também de células T pela secreção de Gal-1.

Norris e Schrimpf (1994) caracterizaram duas proteínas do parasita, que são proteínas regulatórias do complemento (CRP), uma em forma solúvel e outra de membrana. Elas mimetizam as CRPs do hospedeiro, prevenindo sua lise pelo complemento associada às células autólogas, interferindo na ação das

convertases na cascata de ativação do complemento de ambas as vias: clássica e alternativa.

Outra proteína de grande relevância para sobrevivência do *T. cruzi* no hospedeiro é a proteína Tc52, que induz uma supressão da ativação não específica de linfócitos T, pode agir diretamente em macrófagos aumentando a expressão do gene expressante de IL-10, e ainda provoca uma diminuição da expressão de IFN- γ e IL-2. (OUAISSI, 2007).

1.1.4. Transialidase

O *Trypanosoma cruzi* expressa transialidase (TS), enzima que permite a incorporação de resíduos siálicos, a partir de sialoglicoconjugados do hospedeiro, às mucinas do parasita. Esta incorporação protege o parasita contra o sistema imune do hospedeiro, mascarando os sítios de reconhecimento para o sistema imune, e favorece a sua incorporação nas células mamíferas. A TS também é liberada da superfície do parasita na circulação sanguínea o que leva a apoptose de células do sistema imune do hospedeiro (JÄGER; et al., 2008).

A transialidase é codificada por 1430 genes, seu peso molecular varia de 60 a mais que 200 kDa. Destes genes apenas 12 codificam transialidase enzimaticamente ativa. A diferença fundamental em genes que codificam a forma ativa da inativa é a mutação na Tyr342 por His. A maioria das transialidasas contém uma sequência repetitiva de 12 aminoácidos na região C-terminal denominada SAPA, outra variação presente é o diferente grau de glicosilação. Todas estas variações dificultam o planejamento de um fármaco que utiliza como alvo esta enzima. Membros da grande família de genes que codificam a transialidase são classificados em dois grupos de acordo com sua expressão tanto em epimastigotas (*eTs*) ou em tripomastigotas infectivos (*tTs*). Apesar das duas formas apresentarem mesma atividade enzimática e sequências primárias bem conservadas, o tipo *eTs* é uma proteína *trans-*

membrana, enquanto a *tTs* apresenta o domínio C-terminal denominado SAPA e uma porção denominada âncora glicosilfosfatidilinositol que permite sua eliminação (JÄGER; et al., 2008; NERES; et al., 2008).

Durante a fase aguda, a TS lança-se na circulação sanguínea, após a clivagem da âncora GPI, e remove ácido siálico da superfície de plaquetas, causando trombocitopenia (TRIBULATTI; et al., 2005). Ela também induz apoptose em baço, timo, gânglios periféricos e também, em células cardíacas em infecções experimentais. A indução de apoptose contribui para um estado transiente de imunossupressão e estudos prévios têm demonstrado que a apoptose tem um papel patogênico na infecção por *T. cruzi* e que o bloqueio desta pode ser alvo de intervenção terapêutica (TODESCHINI; et al., 2002; VERCELLI; et al., 2005; DOS REIS; LOPES; 2008).

A superfície de tripomastigotas invasivos é coberta por inúmeras transialidases e mucinas fixas na membrana pela âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI). O parasita é incapaz de sintetizar ácido siálico e por isso o adquire do hospedeiro e o transfere para resíduos terminais de β -Gal nas mucinas que recobrem a superfície dos parasitas. A incorporação de ácido siálico propicia ao parasita proteção indireta para os resíduos β -Gal devido à carga negativa do ácido siálico e proteção diante ao reconhecimento pelo Sistema Imune do hospedeiro destes resíduos terminais, além de conferir resistência ao Sistema Complemento do hospedeiro inibindo a lise do parasita, garantindo, portanto, a sobrevivência de tripomastigotas liberados na circulação sanguínea, pois a sialização da superfície do *T. cruzi* é crucial para o estabelecimento da fase crônica da doença (TONLINSON; RAPER, 1998; NERES; et al., 2008; BUCHINI; et al., 2008).

O sítio ativo da TS contém características conservadas de outras sialidases microbianas como, por exemplo, o Asp59 essencial para catálise, contém também, dois importantes resíduos (Tyr342 e Glu230) que estabilizam o estado de transição, a tríade (Arg35, Arg245 e Arg314), as quais interagem com o grupo carboxílico do ácido siálico, e o bolso hidrofóbico responsável pela interação com o grupo *N*-acetil do ácido siálico (BUSCHIAZZO; et al., 2002).

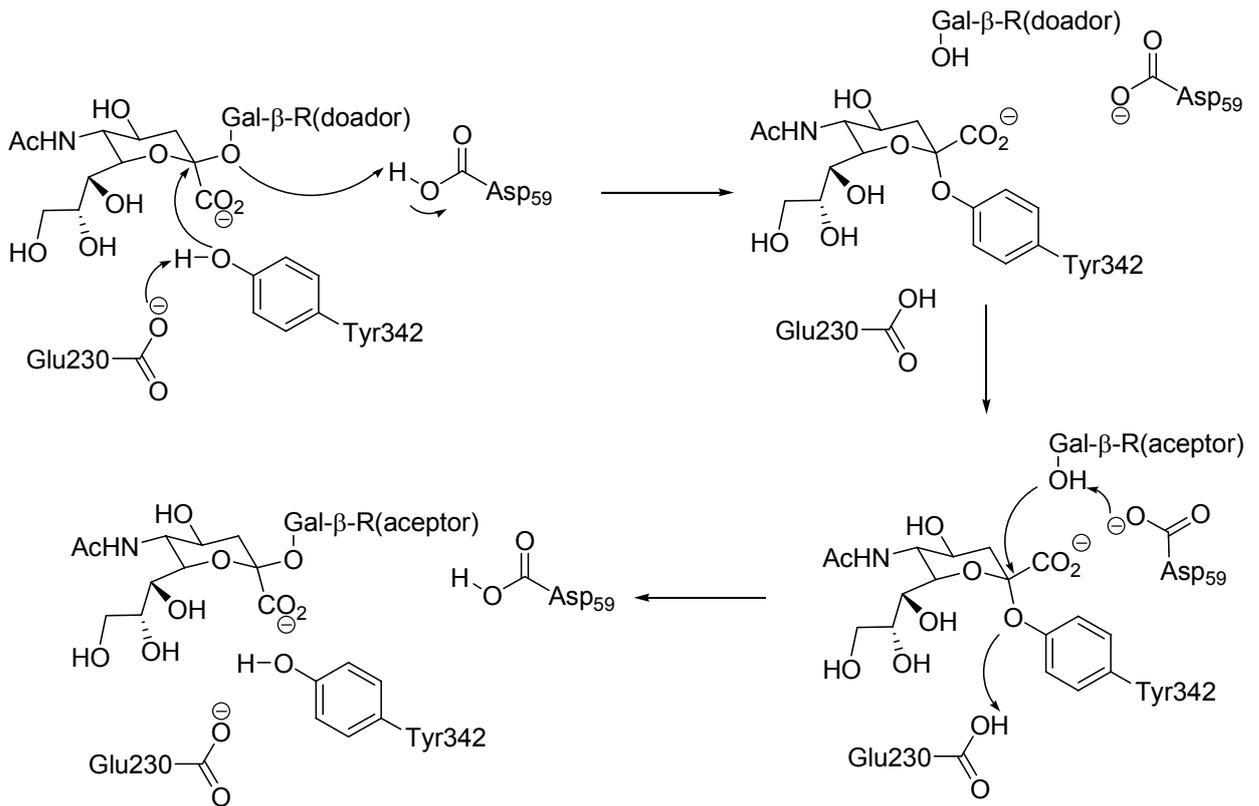


Figura 1.5: Mecanismo de ação da transialidase

O mecanismo de ação da TS é mostrado na figura 1.5. Durante a ligação do substrato doador de ácido siálico no sítio ativo, o grupo hidroxila da Tyr342 reage como um nucleófilo em uma reação de substituição nucleofílica de 2ª ordem, que é assistida por um resíduo próximo Glu230 que atua como um catalisador básico, resultando na formação de uma ligação covalente entre a enzima e o intermediário sialosídeo. O resíduo Asp59 protona o grupo abandonador na primeira reação de substituição nucleofílica de segunda ordem e se torna uma base catalisadora para o segundo passo também de substituição nucleofílica de 2ª ordem (SN2), aceitando o próton do grupo 3-hidroxil do receptor galatosídeo. Isto resulta, sobretudo na retenção de configuração da porção do ácido siálico (NERES; et al., 2008; BUCHINI; et al., 2008).

A TS tem uma região que se liga a galactose terminal que capta o ácido siálico a ser transferido. Este sítio é colocado entre dois resíduos de aminoácidos Trp312 e Tyr119 que interage com galactoses terminais em ligação β nas moléculas aceptoras ou doadoras de ácido siálico. Como esta região é única para a Ts e não é presente nas sialidases dos hospedeiros, mutações nestes resíduos resultam em diminuição ou perda da especificidade ao substrato, todas estas observações demonstram que esta região representa um grande ponto de partida para o desenvolvimento de inibidores específicos para esta enzima (PARIS; et al., 2001; MUCCI; et al., 2006).

Pesquisadores verificaram que a expressão da TS em *T. cruzi* é o maior fator de virulência, fenótipos invasivos são restritos a populações que expressam a TS e que esta enzima foi expressa em níveis significativamente maiores nas cepas mais letais. A importância da TS para a sobrevivência do *T. cruzi* tripomastigota após infecção e subsequente invasão foi avaliada a partir de anticorpos específicos que possuem como alvos epítomos sialiados ou aceptores de ácidos siálicos na membrana do parasita, ou a domínios catalíticos da TS e levaram a uma redução significativa da infecção das células dos hospedeiros (NERES; et al., 2008).

Mesmo com estes dados e conhecimentos surpreendentes a cerca desta enzima ainda não existe nenhum inibidor potente desta, mas a atividade catalítica da TS é um alvo potencial para o tratamento da doença de Chagas, especialmente na prevenção de invasão em células hospedeiras (NERES; et al., 2008; BUCHINI; et al., 2008).

No entanto, existem vários alvos já consagrados de várias enzimas como a Cruzipaína, Tripanotiona redutase, C14 α Esterol Desmetilase, Farnesilpirofosfato Sintase, Diidrofolato Redutase, Hipoxantina Fosforribosiltransferase, entre outros de fundamental importância para a sobrevivência do *T. cruzi* e que possuem inibidores potentes, como por exemplo, vinilsulfonas, tiossemicarbonas, derivados nitrofurânicos, derivados triazólicos e análogos de purinas (Coura; de Castro, 2002).

1.1.5. Cruzipaína

O papel da cisteína protease parece ser relevante em muitos aspectos do ciclo evolutivo dos *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania* e na relação parasito-hospedeiro. Cisteína protease é a enzima chave envolvida na penetração do parasita dentro das células hospedeiras, participa da nutrição do parasita à custa do hospedeiro e está envolvida nos mecanismos de escape do parasita contra o sistema imune do hospedeiro (BOCEDI; et al., 2004).

Doadores de óxido nítrico como NOR-3 e SNAP (figura 1.6) modulam atividade enzimática através de modificação química de resíduos reativos. Eles podem promover modificação química de resíduos Cys de cisteínas proteases, incluindo a cruzipaína, uma cisteína protease do *T. cruzi*, promovendo sua inibição (BOCEDI; et al., 2004).

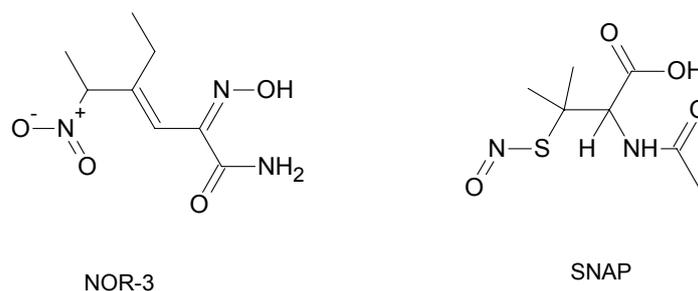


Figura 1.6: Doadores de óxido nítrico.

Engel *et al.* (1998) demonstraram que inibidores irreversíveis de cruzipaína como *N*-metil-fenilalanina-homofenilalanina-vinil-fenil-sulfona podem curar infecções experimentais de *T. cruzi* que seriam letais em camundongos.

Trabalhos anteriores focam inibidores irreversíveis de cruzipaína como vinilsulfonas (figura 1.7) (AXYS PHARMACEUTICALS INC, 2001). Embora estudos em animais demonstrem que estes compostos não são tóxicos em doses terapêuticas, eles apresentam pouca seletividade em relação às cisteínas proteases humanas.

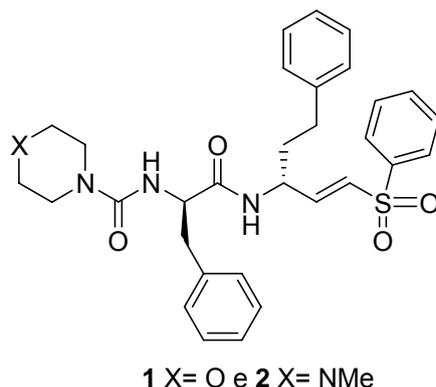
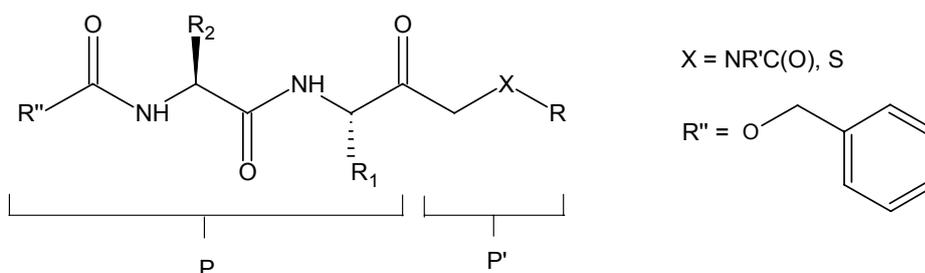


Figura 1.7: Exemplos de vinilsulfonas

Estão sendo realizados estudos clínicos de fase I do composto 2 da figura 1.7 denominado CRA3316 e se as triagens clínicas forem bem sucedidas, o composto talvez represente uma nova alternativa terapêutica para esta doença (AXYS PHARMACEUTICALS INC, 2001).

Huang *et al.* (2002) desenvolveram novos inibidores de cruzipaína com uma alta seletividade maior que 1000 vezes para cruzipaína sobre catepsina B e 100 vezes sobre catepsina L (figura 1.8).

Figura 1.8: Inibidores de cruzipaína propostos por Huang *et al.* (2002) (regiões P e P')

Avaliações utilizando QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) sugerem que a cruzipaína pode acomodar substituintes grandes ou cadeias hidrofóbicas longas de hidrocarbonetos na região P'.

Os mais potentes tinham como R, isopropil, dietilfenil, propionato de etila, *t*-butila e 3-fenilpropil.

Para aumentar a solubilidade, R'' foi trocado pelo grupo oximetilpiridinil (região Cap), a incorporação do grupo oximetil-3-piridinil resultou em inibidores mais potentes que a substituição por oximetil 2 ou 4-piridinil. A homofenilalanina foi trocada pela fenilalanina em P₁, e isto resultou em um aumento da potência de 2 a 4 vezes e diminuiu a degradação proteolítica por proteases humanas. A troca de R'' por oximetilpiridinil exibiu uma seletividade de 5 a 100 vezes para a cruzipaina em relação à catepsina L. Uma grande seletividade é conferida quando P₂ é fenilalanina ou R² é 3-fenilpropil (figura 1.9).

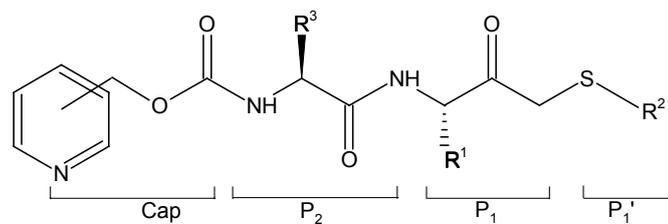


Figura 1.9: Inibidores de cruzipaina propostos por Huang *et al.* (2002)
(regiões: Cap, P₂, P₁ e P₁')

Tiossemicarbazonas é uma classe de pequenas moléculas que têm sido estudadas nos últimos 50 anos como antivirais, antineoplásicos e também por suas propriedades contra *P. falciparum* e *T. cruzi*. Atualmente, a triapina, uma tiossemicarbazona, tem sido avaliada em estudos de fase clínica II como um antineoplásico (GREENBAUM; et al., 2004).

Mais de 100 tiossemicarbazonas foram sintetizadas e testadas como inibidores da cruzipaina (DU; et al., 2002). São semelhantes às nitrossemicarbazonas, mas foi retirado o grupo nitro destes compostos, embora a geração de radical nitro seja crucial para inibição de outra enzima, a tripanotona redutase, que é responsável pela manutenção de um ambiente intracelular reduzido do parasita para proteção contra o estresse oxidativo

produzido por radicais livres liberados pela célula hospedeira, sendo a ação desta enzima essencial para sobrevivência do parasita (BONNET; et al., 2000). Este estudo gerou uma relação de estrutura e atividade básica em relação à cruzipaina (figura 1.10).

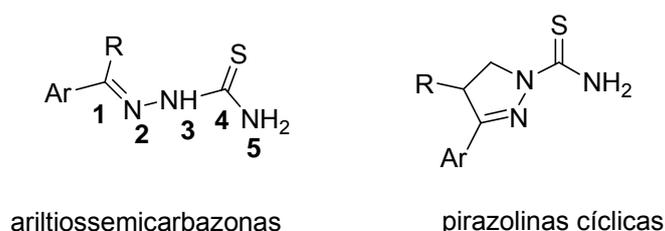


Figura 1.10: Estrutura geral das ariltiossemicarbazonas e pirazolinas cíclicas

As tiossemicarbazonas exibiram uma específica e consistente relação estrutura X atividade. A redução da ligação C=N ou mudança de C=S por C=O resultou em diminuição da atividade. Para compostos com apenas 1 anel benzênico, substituições em posições específicas podem aumentar a atividade. Os compostos mais potentes têm a substituição na posição 3 no anel aromático, compostos com os substituintes: trifluormetil, bromo e cloro resultam em potentes inibidores, enquanto outros substituintes conferem pobre atividade. A dissustituição com 3,4-dicloro ou 3,5-ditruormetil resultou em inibidores potentes. A dissustituição nas posições 2 e 4 não aumentou a atividade e substituições na porção tioamida amina resultou em perda da atividade (DU; et al., 2002).

Compostos com anel benzênico ligado a um anel heteroaromático de 5 membros também foram inibidores efetivos da cruzipaina. Um grupo etila na posição 5 foi favorável em muitos compostos. A conexão do grupo etila na posição 5 e N-3 formando pirazolinas cíclicas resultaram em compostos muito potentes. Estas pirazolinas podem ter aumentado a seletividade para cruzipaina e também as propriedades farmacocinéticas (figura 1.10) (DU; et al., 2002).

Em outro estudo desta classe de compostos, Greenbaum *et al.* (2004) exploraram a substituição no anel aromático e também substituições no grupo terminal tioamida amina. Neste estudo, verificou-se que a substituição nas posições meta e para do anel aromático por fenil e fenil éter não foi mais potente *in vitro* contra cruzipaina que o composto que possui um bromo na posição meta, no entanto, a atividade *in vitro* de arilaminas nestas mesmas posições foi inexpressiva. Substituição na porção tioamida amina resultou em decréscimo da atividade.

Neste estudo também foi comparado à atividade inibitória *in vitro* da enzima com a atividade de proteção a macrófagos de células hospedeiras contra *T. cruzi*. Compostos que contêm substituintes fenil e fenil éter na posição meta do anel aromático apresentaram eficácia tanto ao parasita quanto para enzima, no entanto, a substituição de arilamina nas posições meta e para, mostraram-se ineficientes na inibição da enzima *in vitro*, mas mostrou uma excelente atividade contra o parasita e o mesmo ocorreu para os compostos 2 ou 3 ou 4-acetilpiridina tiossemicarbazona. Os compostos 3 e 4-acetilpiridina foram de baixa eficácia contra enzima e parasita, no entanto, o composto 2-acetilpiridina apesar de sua baixa atividade enzimática demonstrou ser bastante ativo contra o parasita. Estas diferenças de atividade enzimática e antiparasitária podem ser explicadas pela ação somatória de outro alvo envolvido e no caso específico da 2-acetilpiridina tiossemicarbazona, que é um quelador de metal tridentado, que pode atuar como um agente quelante de ferro e cobre (GREENBAUM; et al., 2004).

Fujii *et al.* (2005) avaliaram diferentes substituintes na posição “R” para derivados de tiossemicarbazonas e suas atividades enzimáticas inibitórias de cruzipaina (figura 1.11). A substituição de um grupo etil por *N*-butil, aumentou duas vezes a atividade, mas a incorporação de grupos alquílicos volumosos como *t*-butil diminuiu a atividade. Já a substituição por grupos aromáticos conectados por diferentes ligantes como metileno, alqueno, éter possuem potência equivalente quando o substituinte é etil.

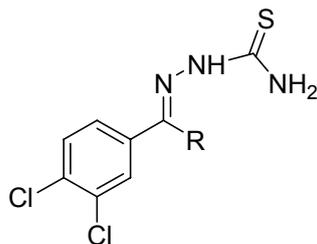


Figura 1.11: Estrutura geral dos compostos propostos por Fujii *et al.* (2005)

Siles *et al.* (2006) expandiram os conhecimentos de relação estrutura e atividade incluindo análogos com anéis fundidos e benzofenonas funcionalizadas descobrindo nestes compostos, inibidores potentes de cruzipaina (figura 1.12).

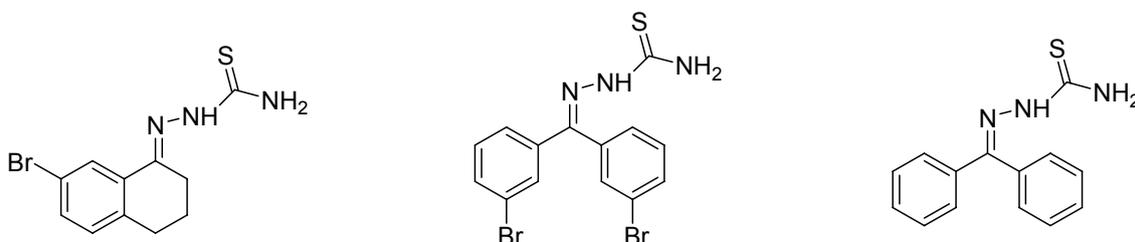


Figura 1.12: Estrutura geral dos compostos propostos por Siles *et al.* (2006)

Chiyanzu *et al.* (2003) estudaram compostos derivados de isatinas e tiossemicarbazonas. Enquanto isatinas por si só não apresentam atividade contra *T. cruzi*, os seus derivados apresentando a porção tiossemicarbazona foram ativos, principalmente aqueles que continham substituições apropriadas no anel aromático (figura 1.13).

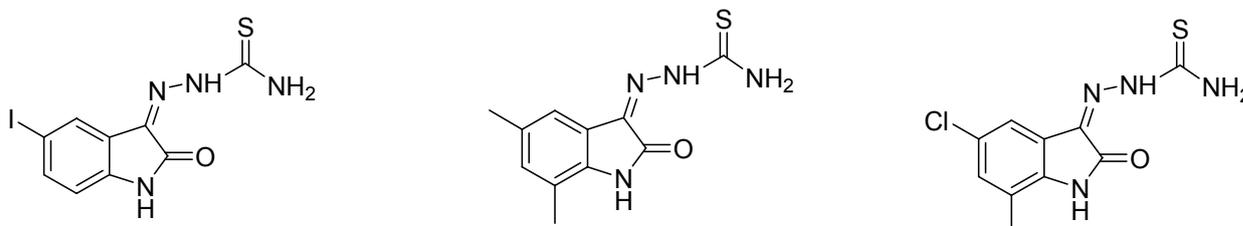


Figura 1.13: Estrutura geral dos compostos propostos por Chiyanzu *et al.* (2003)

Porcal *et al.* (2008) sintetizaram derivados híbridos de hidrazona (semicarbazona, tiossemicarbazona e amidinohidrazona) e benzofuranos. Os compostos da figura 1.14 apresentaram as maiores atividades *in vitro*, sendo que o composto 1 e 2 apresentaram atividade inibitória somente para cruzipaina, enquanto o composto 3 apresentou também atividade para tripanotona reductase.

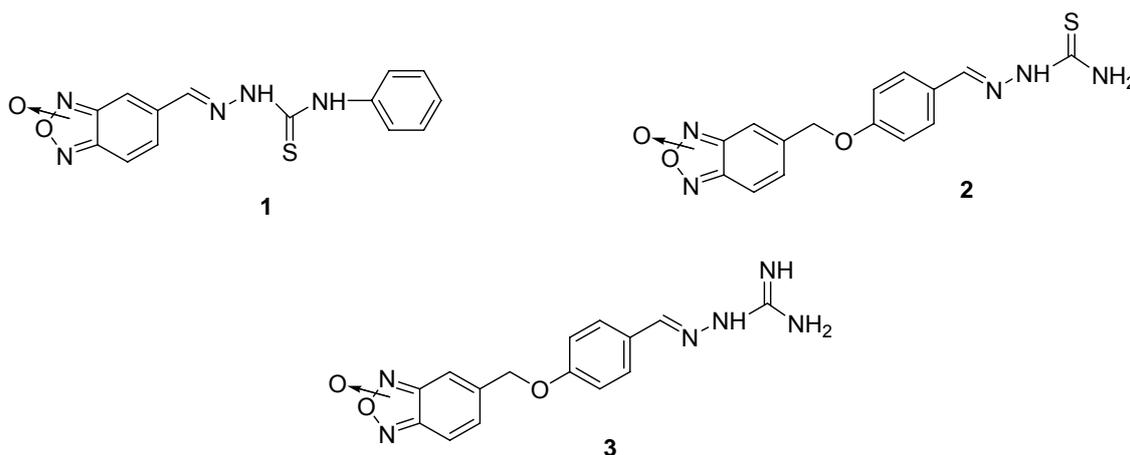


Figura 1.14: Estrutura geral dos compostos propostos por Porcal *et al.* (2008)

1.1.6. Mutagenicidade e Genotoxicidade do Grupo Nitro

O ensaio de mutagenicidade em *Salmonella*, Teste de Ames, tem sido bastante utilizado em laboratórios de pesquisa e por agências regulatórias como uma ferramenta de grande utilidade para detectar mutagênicos químicos encontrados no meio ambiente, produtos naturais, pesticidas e candidatos a fármacos. A avaliação da mutagenicidade em cepas TA98, TA100, TA1535 e TA1537 tem sido proposta na literatura como uma rotina inicial de monitoramento (Ames; et al., 1973; GATEHOUSE; et al., 1994).

A classificação de compostos como mutagênicos ou não resulta da combinação de dados de monitoramento das diferentes cepas. Compostos são

considerados mutagênicos se eles dão um resultado positivo para alguma cepa, com ou sem ativação do sistema de ativação metabólica de camundongo (mistura S9). Neste caso, a análise dos resultados de cada cepa será realizada independentemente para avaliar aspectos diferentes do potencial mutagênico de um composto (Ames; et al., 1973; LLORENZ; et al., 2002).

Compostos que apresentam grupo nitro estão propensos a serem reduzidos a hidroxilaminas e geralmente exibem potente atividade mutagênica, no entanto existem vários compostos com o grupo nitro na terapêutica, alguns exemplos são mostrados na figura 1.15 (TOKIWA; OHNISHI, 1986; ROSENKRANZ; MERMELSTEIN, 1983).

Lopes de Compadre *et al.* sugeriram que a mutagenicidade de nitrocompostos é altamente dependente de suas energia Lumo e hidrofobicidade (LOPEZ DE COMPADRE; et al., 1988; LOPEZ DE COMPADRE; et al., 1990; DEBNATH; et al., 1991; DEBNATH; et al., 1992b). É conhecido que a energia Lumo (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) correlaciona o potencial de redução polarográfico meia-onda, o qual tem sido demonstrado corresponder ao potencial de redução ou eletro-afinidade de nitroarenos, uma menor energia Lumo significa maior potencial de mutagenicidade (MISAKI; et al., 2008). Já a hidrofobicidade está relacionada com a penetração fácil dentro das células, portanto, os compostos mais hidrofílicos têm uma penetração menor e por isso apresentam menor mutagenicidade (KLOPMAN; et al., 1984; LOPEZ DE COMPADRE; et al., 1988; LOPEZ DE COMPADRE; et al., 1990; DEBNATH; et al., 1991; DEBNATH; et al., 1992a; DEBNATH; et al., 1992b; DEBNATH; HANSCH, 1992).

Llorenz *et al.* (2002) estudaram várias propriedades estéricas e eletrônicas de 270 compostos que contém grupo nitro e puderam analisar propriedades e fragmentos moleculares que mais comumente resultem em um resultado positivo ou negativo para o teste de Ames. A presença do grupo nitro por si só não confere a um composto mutagenicidade, mas a eletro-afinidade dos compostos oferecem uma significativa discriminação entre compostos positivos e negativos (figura 1.15).

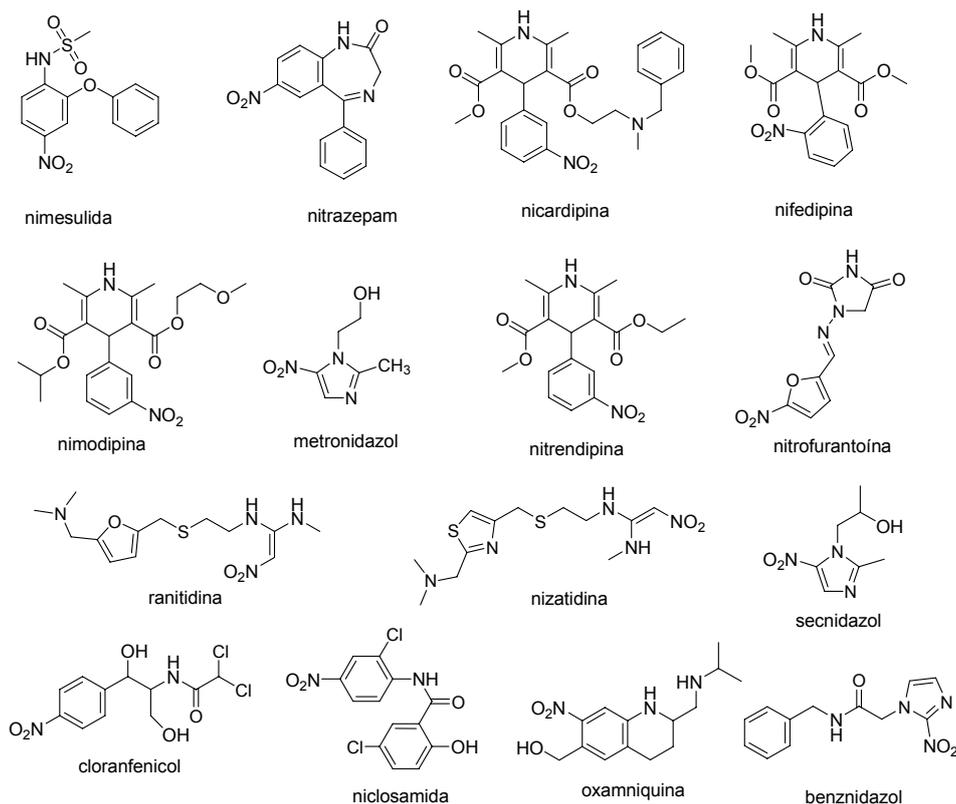


Figura 1.15: Compostos da terapêutica que apresentam grupo nitro

Há diferenças significativamente claras nas propriedades de compostos positivos e negativos. Compostos negativos possuem em média peso molecular menor, uma menor área superficial acessível a solvente e eletroafinidade também menor, mas apresentam maiores globularidade, $C\text{-Log}P$ e potencial de ionização (LLORENZ; et al., 2002).

Em estudos anteriores dos mesmos autores, foram analisadas as propriedades de fragmentos que podem conferir mutagenicidade a uma molécula. Eles verificaram que a introdução de certos grupos funcionais, como cadeias alifáticas ou grupos carboxílicos, pode diminuir o potencial mutagênico de um composto. Também a troca de outros grupos funcionais como nitro, ou decréscimo de centros aceptores de ligação de hidrogênio pode aumentar as chances de tornar um composto não mutagênico (LLORENS; et al., 2001).

1.2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de compostos derivados de tiossemicarbazona com atividade antichagásicas, apresentando um grupo químico passível de sofrer derivatização.

Objetivos específicos

1. Obtenção dos compostos amínicos potencialmente inibidores da enzima cruzipaína baseados em estudos prévios da literatura de relação estrutura x atividade (SAR);
2. Teste *in vitro* de atividade tripanocida dos compostos obtidos;
3. Ensaio de mutagenicidade (teste do micronúcleo) em camundongos com os compostos mais ativos.

1.3. MATERIAIS E MÉTODOS

1.3.1. Materiais

1.3.1.1. Síntese dos Compostos Derivados de Tiossemicarbazona

3-aminoacetofenona (Flucka), 4-aminoacetofenona (Flucka), fenacilamina (Flucka), α -bromo-4-nitroacetofenona (Acros), acetofenona (Flucka), tiossemicarbazida (Acros), ácido nítrico concentrado (99,5%) (Synth), anidrido acético (Merck), ácido sulfúrico concentrado (Synth), hexamina (Synth), anidrido succínico (Merck), DMAP (Flucka), acetonitrila (Synth), etanol (Synth), ácido acético (Synth), diclorometano (Synth), acetona (Synth), éter etílico (Synth), NaOH (Synth), pentóxido de fósforo (Synth).

1.3.1.2. Atividade Tripanocida

Dimetilsulfóxido p.a (Merck), meio Lit (**liver Infusion Tryptose**) soro bovino fetal (Cultilab), formazan (Flucka), brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (Sigma), metanossulfonato de fenazina (Sigma), Placas de Elisa 96 poços.

1.3.1.3. Ensaio de Mutagenicidade – Teste de Micronúcleo

benznidazol (Aldrich), carboximetilcelulose (Synth), Tween 40 (Synth), ciclofosfamida (Aldrich), laranja de acridina (Acros).

1.3.2. Métodos

Os procedimentos experimentais detalhados estão descritos no Anexo A (pg.124).

1.3.2.1. Síntese dos Derivados de Tiossemicarbazona

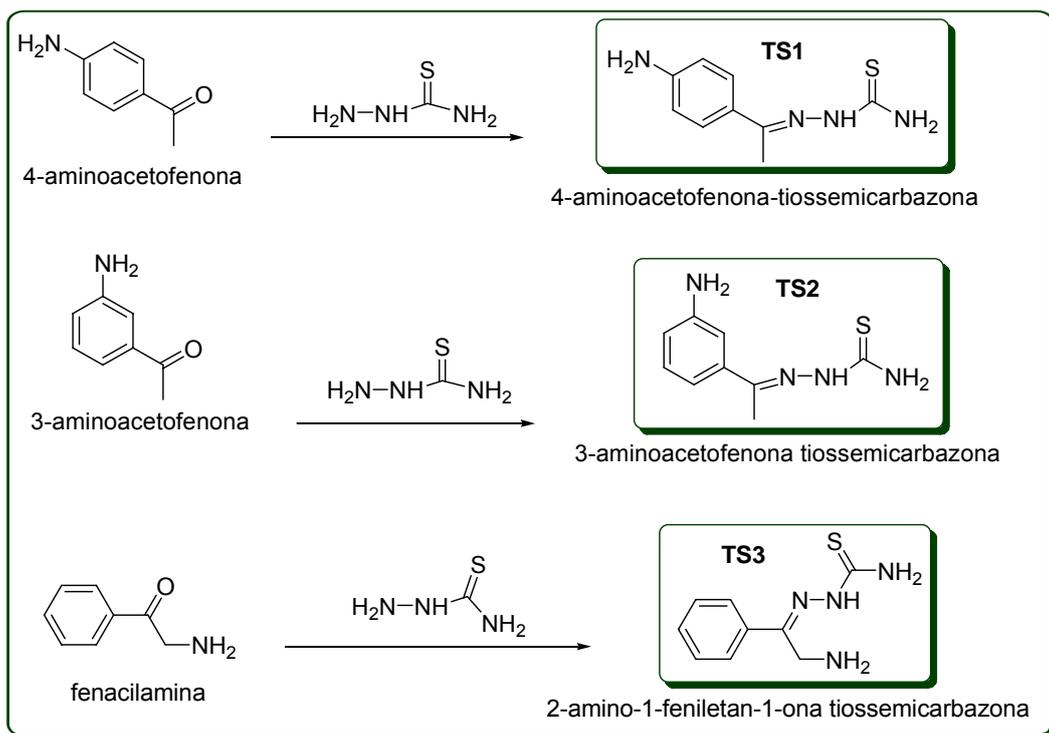
As seguintes moléculas (tabela 1.1) derivadas de tiossemicarbazona e contendo um grupamento amina livre foram planejadas segundo dados da literatura sobre estudos de QSAR (DU; et al., 2002).

Estas moléculas são obtidas reagindo-se diretamente os compostos cetônicos com a tiossemicarbazida, gerando os derivados não nitrados (esquema 1.1). Alguns compostos são obtidos a partir da proteção do grupamento amínico antes da reação de nitração, evitando assim a formação de sais de diazônio nestas aminas o que levaria à formação de produtos indesejáveis, e finalizando com a desproteção destes grupos após a nitração do anel aromático e reação com tiossemicarbazida (esquema 1.2). Outros compostos foram obtidos a partir da acetofenona de acordo com o esquema 1.3, ou da 2-bromo-1-(4-nitro)acetofenona, esquema 1.4.

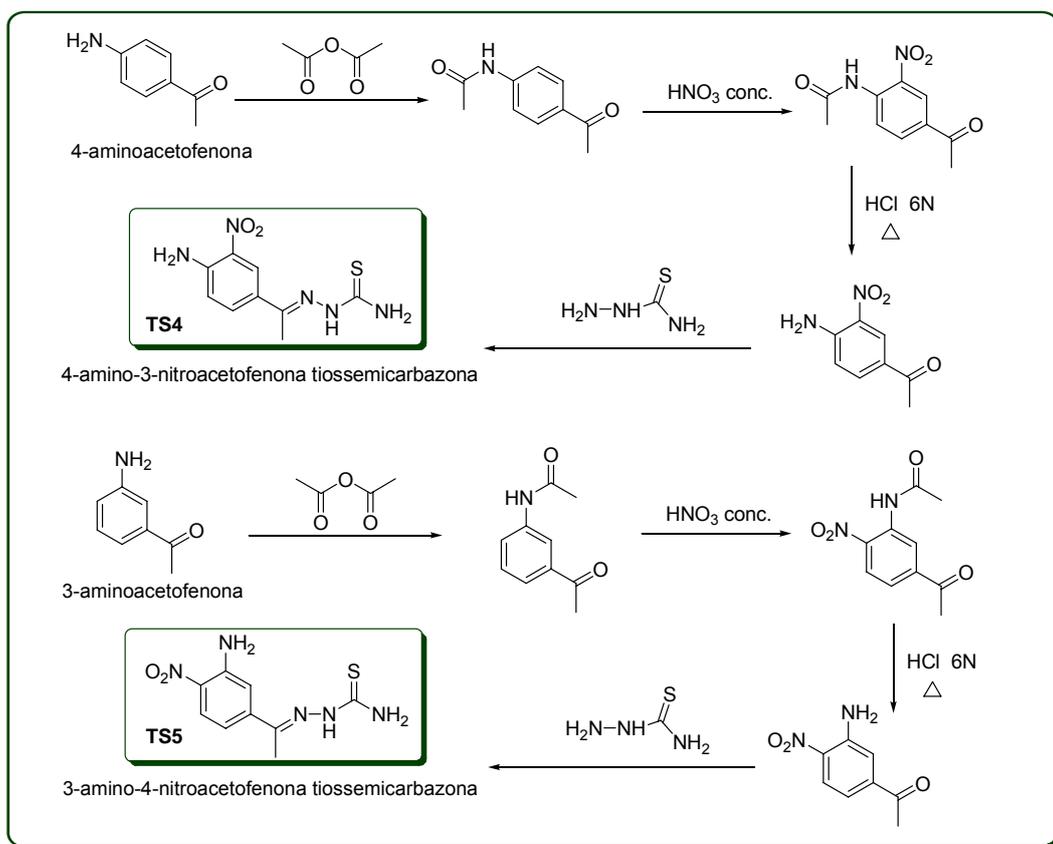
Os compostos foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear, realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), por Espectrometria de Infravermelho Shimadzu modelo FTIR-8300, e Espectrometria de massas realizada na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), por injeção direta e com ionização por impacto eletrônico.

Tabela 1.1: Moléculas propostas potencialmente antichagásicas

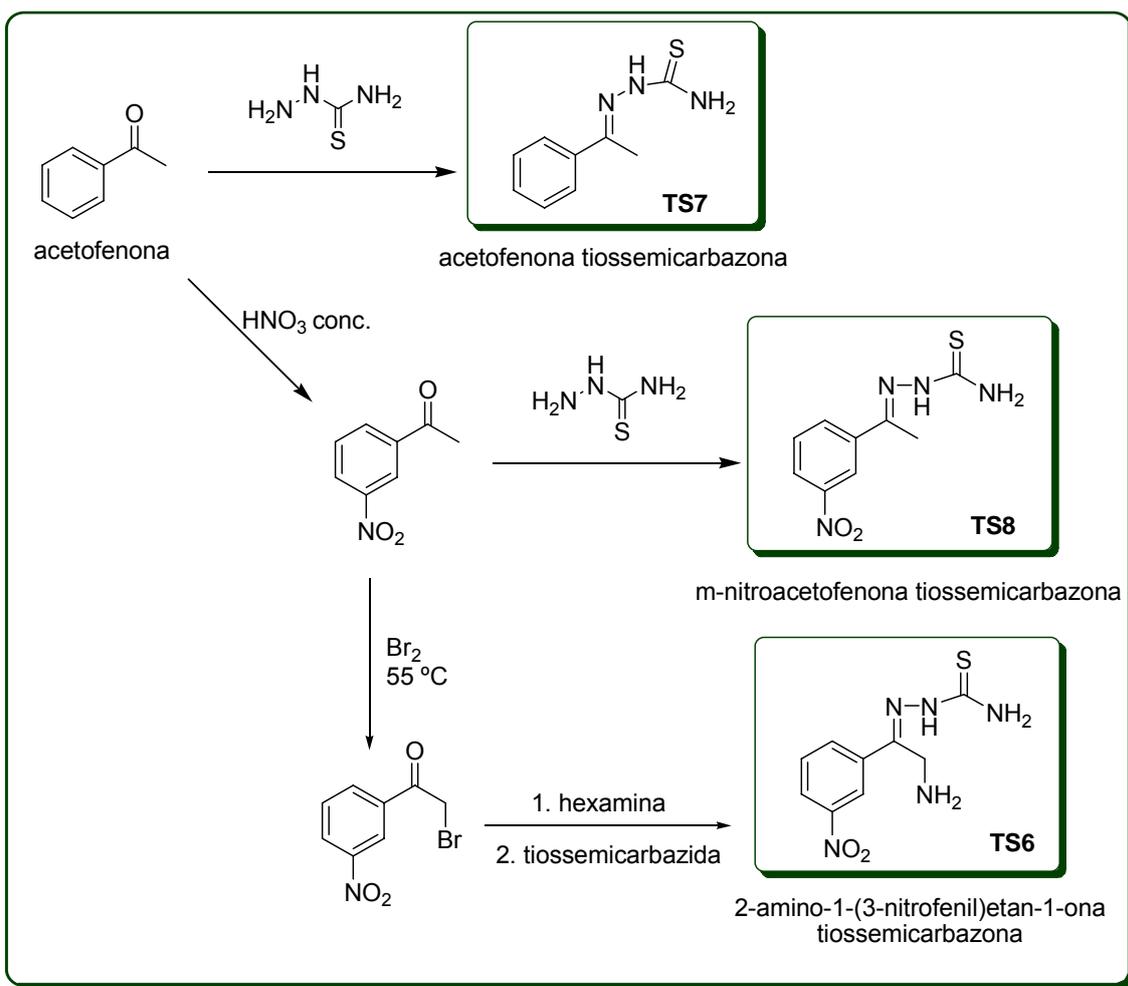
Composto	Nome	Estrutura
TS-1	4-aminoacetofenona tiossemicarbazona	
TS-2	3-aminoacetofenona tiossemicarbazona	
TS-3	2-amino-1-feniletan-1-ona tiossemicarbazona	
TS-4	4-amino-3-nitroacetofenona tiossemicarbazona	
TS-5	3-amino-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona	
TS-6	2-amino-1-(3-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona	
TS-7	acetofenona tiossemicarbazona	
TS-8	m-nitroacetofenona tiossemicarbazona	
TS-9	2-amino-1-(4-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona	
MTS-9	Hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona	
TS-10	2-hidroxi-1-(4-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona	
MTS-10	Hemissuccinato de 2-hidroxi-1-(4-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona	



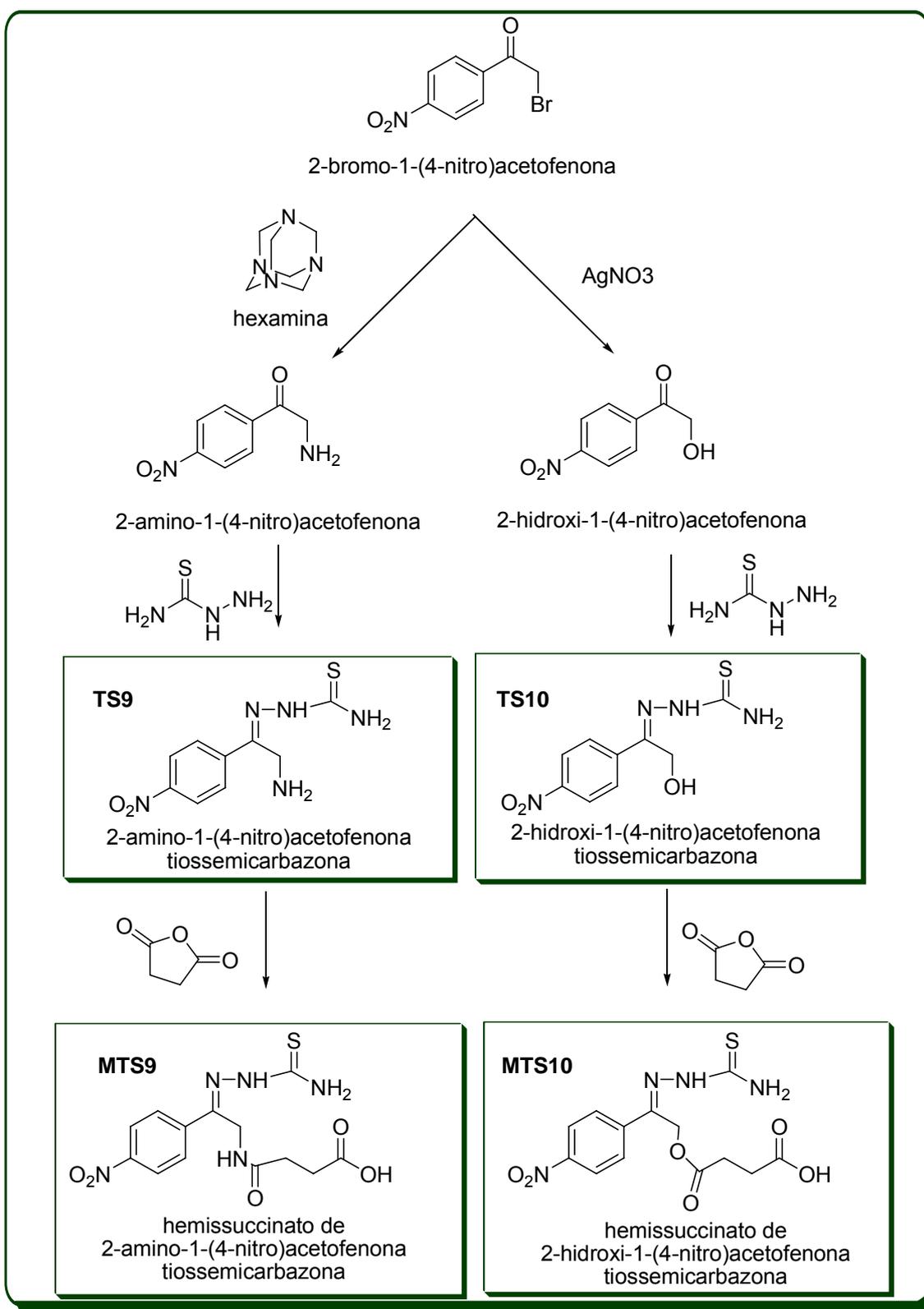
Esquema 1.1: Obtenção dos compostos TS1, TS2 e TS3



Esquema 1.2: Obtenção dos compostos TS4 e TS5 a partir da *meta* ou *para* aminoacetofenona



Esquema 1.3: Obtenção dos compostos TS6, TS7 e TS8 a partir da acetofenona



Esquema 1.4: Obtenção dos compostos TS9, TS10, MTS9 e MTS10 a partir da 2-bromo-1-(4-nitro)acetofenona

1.3.2.2. Teste *In Vitro* de Atividade Tripanocida

O teste de atividade tripanocida foi realizado na FCFar (Unesp / Araraquara) no Laboratório de Imunologia sob orientação da Profa. Dra. Regina Cicarelli e colaboração da Mestre Gabriela Duó Passerine. O ensaio foi realizado em triplicata e em placas de poliestireno de 96 poços estéreis e com tampa, empregando-se cepa Y de *T. cruzi* em meio LIT (Liver Infusion Tryptose). A quantidade de parasitas mortos para cada concentração das substâncias testadas foi medida espectrofotometricamente empregando-se o método colorimétrico da redução do MTT em formazan.

Emprega-se neste ensaio a forma epimastigota de *T. cruzi* por ser uma forma não infectante e de fácil manutenção em cultura. Utilizou-se culturas de 7 dias, na fase log de crescimento.

1.3.2.3. Ensaio de Mutagenicidade - Teste do Micronúcleo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara (Protocolo CEP/FCF/CAR. Nº 38/2008) e foi realizado com a colaboração da Mestre Priscila Longhini Bosquesi.

Para avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos compostos (TS-9, MTS-9, TS-10 e benznidazol), empregou-se camundongos Swiss albinos (com cerca de 30 g). Foram avaliadas três doses de cada um dos fármacos, administradas aos animais via *gavage*.

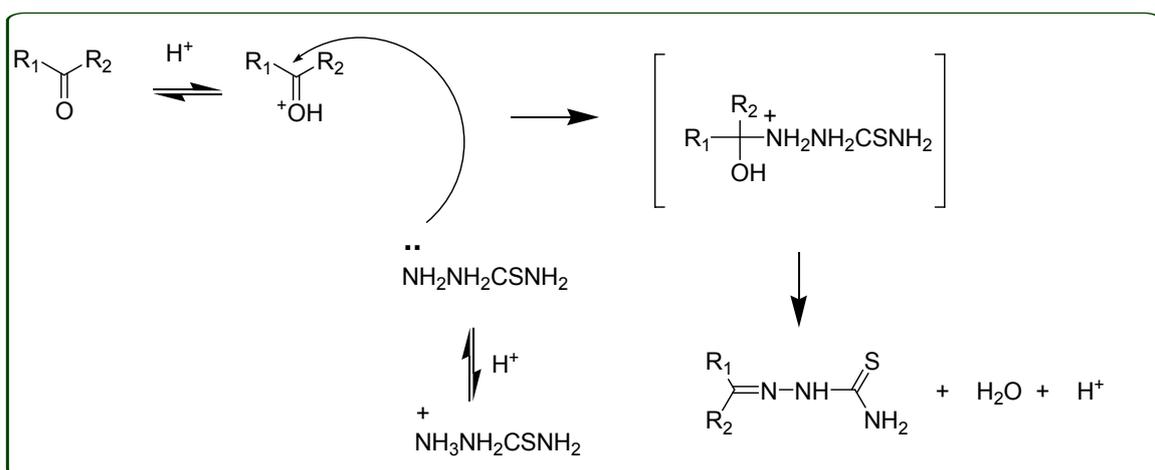
O grupo controle positivo foi feito com animais tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.). O grupo controle negativo recebeu via *gavage* 0,3 mL da solução de carboximetilcelulose (CMC) 1% e Tween 40 0,2%.

Foram coletadas amostras de sangue da cauda de 10 animais que foram tratados somente com água, com o objetivo de se obter assim a frequência basal de micronúcleos para cada indivíduo (controle-interno). Trinta horas depois da administração dos compostos (TS-9, MTS-9, TS-10 e benznidazol) aos animais, foi realizada a coleta de sangue para a avaliação da mutagenicidade aguda dos fármacos.

1.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.4.1. Mecanismo de formação dos derivados de tiossemicarbazonas

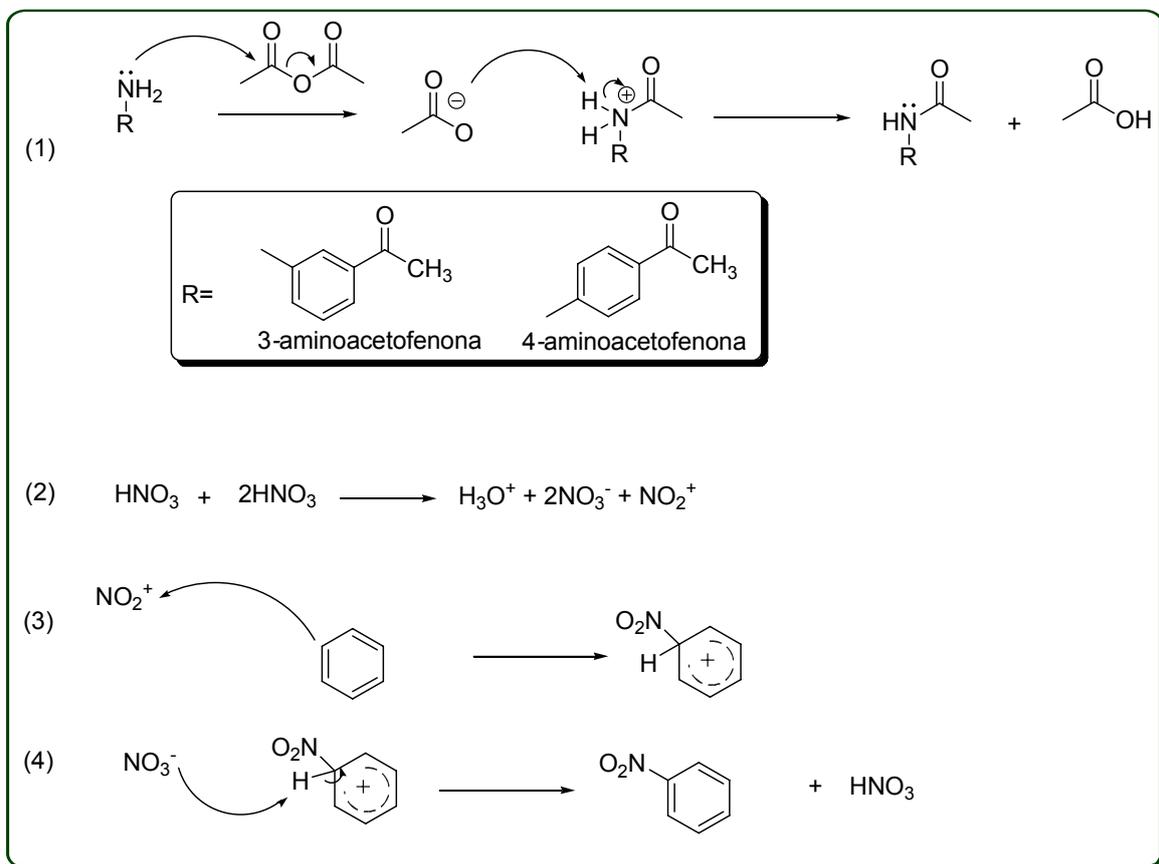
O mecanismo de reação de formação das tiossemicarbazonas se processa através do ataque nucleofílico da tiossemicarbazida ao átomo de carbono carbonílico (esquema 1.5). A protonação do átomo de oxigênio dos compostos cetônicos se faz necessário, pois torna o carbono carbonílico ainda mais susceptível ao ataque nucleofílico, sendo esta reação de adição favorecida pelo aumento da concentração hidrogeniônica. No entanto, a concentração hidrogeniônica deve ser suficientemente ácida para que uma fração apreciável do composto carbonílico se encontre protonada, mas evitando-se uma protonação excessiva da tiossemicarbazida, o que foi alcançado mantendo-se o pH entre 3 e 4. A condição exata da concentração hidrogeniônica a ser utilizada depende, portanto, da nucleofilicidade do reagente e da reatividade do composto carbonílico (MORRISON; BOYD, 1996).



Esquema 1.5: Mecanismo de formação de tiossemicarbazonas

1.4.2. Mecanismo de Formação e Síntese dos Compostos Nitrados Derivados de Tiossemicarbazona

A reação de proteção do grupamento amina ocorre através do ataque nucleofílico das aminoacetofenonas ao carbono carbonílico do anidrido acético, ocorrendo liberação de uma molécula de ácido acético (esquema 1.6). Já a reação de nitração ocorre através de uma substituição aromática eletrofílica, onde o íon nitroílo, NO_2^+ , que é a partícula eletrófila ataca o anel aromático, formando o íon benzenônio. O íon básico NO_3^- extrai então um próton do íon benzenônio, formando o produto de substituição (MORRISON; BOYD, 1996).



Esquema 1.6: Mecanismo de formação dos compostos nitrados derivados de tiossemicarbazona

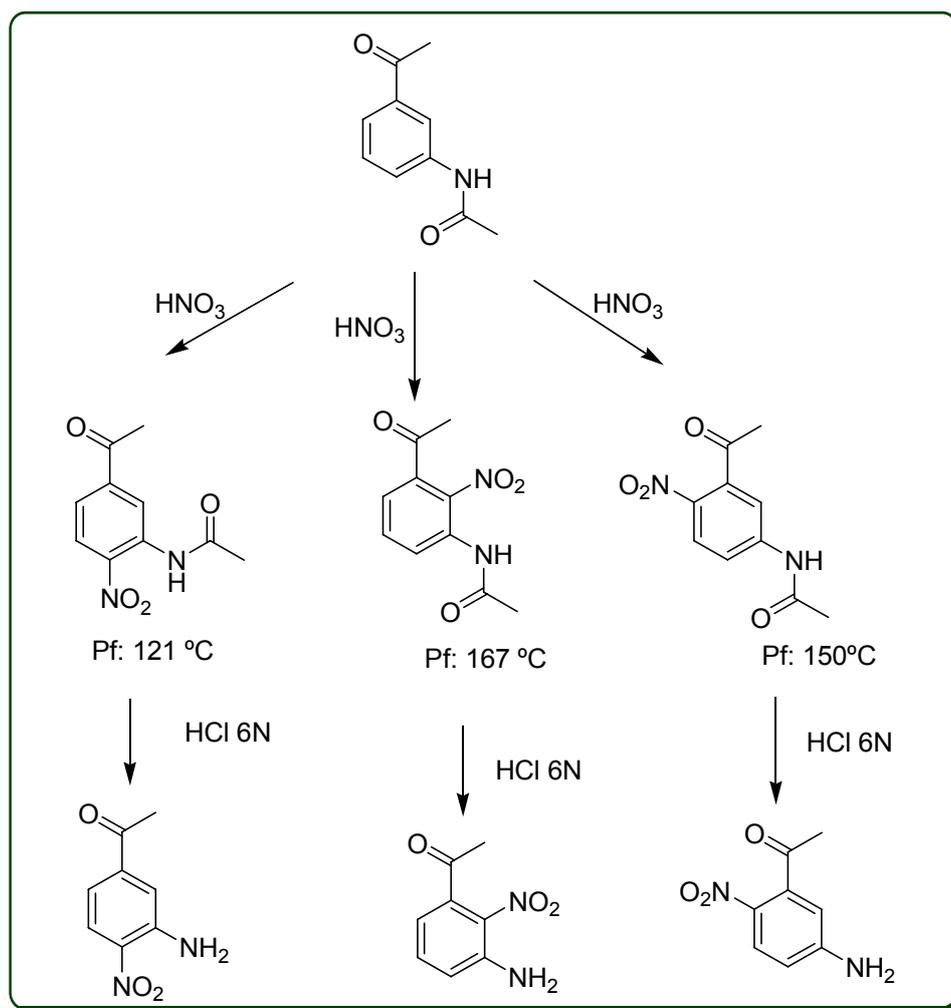
A reação de proteção do grupamento amina, antes da reação de nitração, se faz necessária para que não ocorra durante o processo de nitração a formação de sal de diazônio neste grupamento amina. A formação deste sal levaria a formação de derivados diazotados.

A presença de um ou mais substituintes no anel torna a substituição aromática eletrofílica mais complicada. Existem grupos que são fortemente ativantes (*orto* e *para* dirigentes), como $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NR}_2$ e $-\text{NHCOCH}_3$ (este último é moderadamente ativante), grupos que são desativantes do anel aromático (*meta* dirigentes), como $-\text{NO}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$, $-\text{CN}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COR}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$ e $-\text{COOR}$, e ainda grupos desativantes *orto* e *para* dirigentes, tais como $-\text{F}$, $-\text{Cl}$, $-\text{Br}$ e $-\text{I}$ (MORRISON; BOYD, 1996).

Todavia, mesmo havendo substituintes é possível fazer prognósticos de acordo com as seguintes generalizações: a) Ação de grupos fortemente ativantes sobrepõem-se, em geral, à de grupos desativantes ou fracamente ativantes, e b) em geral há pouca substituição na posição situada entre dois grupos que são *meta* um em relação ao outro. Em muitos casos, a substituição processa-se como se não houvesse espaço suficiente entre eles para que ocorra substituição apreciável nesta posição (MORRISON; BOYD, 1996).

No caso da 4-aminoacetofenona, a qual possui dois substituintes: um grupo $-\text{COR}$ (desativante, *meta* dirigente) e um grupo $-\text{NHCOCH}_3$ (moderadamente ativante, *orto* e *para* dirigente), apenas um produto a partir de reação de mononitração é formado preferencialmente, o 3-nitro-4-*N*-acetilaminoacetofenona.

A reação de substituição eletrofílica do íon nitroílo na 3-aminoacetofenona se processa sem a predominância de apenas um composto, sendo possível a formação de três isômeros devido à ativação diferenciada dos dois substituintes do anel aromático em relação às posições preferenciais de ataque do íon nitroílo (esquema 1.7). Dependendo das condições reacionais apenas 2 isômeros se formam, podendo de acordo com as condições empregadas ocorrer variação na proporção entre eles (WATERS, 1945; LEONARD; BOYD, 1946).

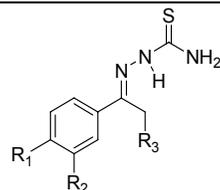


Esquema 1.7: Formação dos isômeros durante reação de nitração a partir da 3-N-acetilaminoacetofenona

1.4.3. Caracterização Espectrofotométrica dos Compostos Obtidos

Em geral, os compostos foram obtidos com rendimento médio de 65%, e a purificação do produto final feita facilmente através de lavagem com água ou recristalização a partir de metanol.

A identificação estrutural dos compostos foi feita por espectrofotometria de infravermelho e ressonância magnética nuclear (RMN ^1H). Através da análise dos resultados obtidos por infravermelho, podemos observar a presença dos grupos funcionais que caracterizam estas moléculas, ou seja, a porção tiossemicarbazona, compostas pelos grupamentos C-N, C=S, C-N-S, N-N e C=N, conforme apresentado na tabela 1.2, podemos observar a presença destes grupamentos em todas as estruturas, havendo alguma modificação na frequência de absorção dada à influência de grupos funcionais adicionais característicos de cada estrutura, como a presença de grupo nitro aromático, ou amina aromática ou alifática. As figuras contendo os espectros obtidos para cada composto são mostradas no Apêndice A (pg. 100).

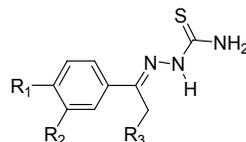
Tabela 1.2: Absorções no infravermelho dos compostos derivados de tiossemicarbazona (ν em cm^{-1})

Composto	R1	R2	R3	deformação de NH		C=N def. axial	NO ₂		N-N def. axial	N-C-S def. axial	C-N def. axial	C=S def. axial
				axial	angular		Def. axi. ass.	Def. axi. sim.				
TS1	NH ₂	H	H	3447- 3150	1590	1622	---	---	1489	1281	1186	1099
TS2	H	NH ₂	H	3440- 3144	1582	1616	---	---	1485	1281	1246	1101
TS3	H	H	NH ₂	3389- 3163	---	1595	---	---	1541	1308	1244	1018
TS4	NH ₂	NO ₂	H	3466- 3155	1589	1634	1508	1339	1468	1246	1178	1086
TS5	NO ₂	NH ₂	H	3315- 3165	1605	1630	1516	1327	1468	1242	1105	1088
TS6	H	NO ₂	NH ₂	3389- 3215	---	1589	1539	1356	1443	1285	1111	1043
TS7	H	H	H	3410- 3148	---	1589	---	---	1512	1288	1096	1096
TS8	H	NO ₂	H	3395- 3148	---	1597	1512	1350	1512	1296	1096	1096
TS9	NO ₂	H	NH ₂	3487- 2986	---	1596	1512	1342	1512	1288	1096	1096
TS10	NO ₂	H	OH	3402- 3163	---	1604	1512	1342	1512	1265	1064 (C- O)	1126
MTS9*	NO ₂	H	NH-(C=O)- C ₂ H ₄ CO ₂ H	3493- 3067	---	1591	1521	1338	1492	1295	1126	1126
MTS10**	NO ₂	H	O-(C=O)- C ₂ H ₄ CO ₂ H	3433- 3163	---	1612	1512	1342	1465	1250	1172	1172

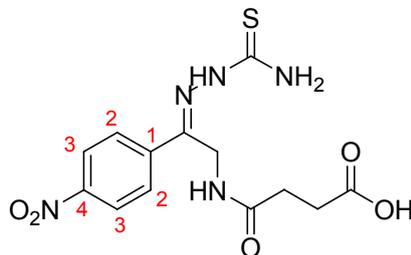
* deformação axial C=O amida: 1624 cm^{-1} . ** deformação axial C=O éster: 1728 cm^{-1}

De posse do conhecimento da existência dos grupamentos funcionais desejados, evidenciado pela análise de infravermelho, a confirmação estrutural foi realizada por RMN ^1H , onde o cálculo das integrais da área dos picos nos fornece uma importante informação acerca do número de átomos de hidrogênio que compõem a molécula, e ainda, através dos valores das constantes de acoplamento, podemos prever a disposição dos grupos funcionais ligados diretamente ao anel aromático. O uso das duas técnicas empregadas é o suficiente para a caracterização desejada, visto as estruturas serem muito semelhantes, o que facilita uma análise comparativa das absorções encontradas, e a simplicidade das reações de obtenção dos compostos, uma vez que partimos na maioria das vezes de duas substâncias puras adquiridas no mercado. Na tabela 1.3 estão atribuídos os deslocamentos químicos de RMN ^1H (os espectros de RMN são mostrados no Apêndice B pg. 106)

Contudo, a molécula TS9 não pode ser adequadamente caracterizada por RMN dada sua insuficiente solubilidade nos solventes orgânicos deuterados mais usualmente empregados em RMN (DMSO- d_6 , Metanol- d_4 , D_2O , CDCl_3 , e acetonitrila- d_3). Apesar disto, o infravermelho apresenta-se consistente com as absorções encontradas nos demais compostos, o que sugere a obtenção do composto; e ainda, o composto TS9 foi posteriormente derivatizado com um grupamento hemissuccínico, o qual pode ser precisamente caracterizado, inclusive através de técnicas bidimensionais de RMN HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) (tabela 1.4, o espectro se encontra no Apêndice B, pgs. 116 a 118), o que reforça ainda mais a obtenção do composto, uma vez que se o primeiro não existisse seu derivado não poderia ser obtido.

Tabela 1.3: Deslocamento químico (ppm) de RMN ¹H dos compostos derivados de tiossemicarbazonas

Comp.	R1	R2	R3	S=C-NH ₂	NH	CH ₂ ou CH ₃	H aromático	NH arom. ou alif.	OH alif.	CH ₂ -CH ₂ hemissuc.	COOH hemissuc.
TS1	NH ₂	H	H	1H, 7,7 s 1H, 8,1 s	1H, 10,0 s	3H, 2,2 s	2H, 6,5 d, J=8,0 2H, 7,6 d, J=8,0	2H, 5,5 s	---	---	---
TS2	H	NH ₂	H	1H, 7,7 s 1H, 8,3 s	1H, 10,2 s	3H, 2,2 s	2H, 7,0 d, J=8,0 1H, 6,6 t, J=8,0 1H, 7,1 s	2H, 5,1 s	---	---	---
TS3	H	H	NH ₂	2H, 8,5 sl	1H, 9,4 s	2H, 4,0 s	5H, 7,4-7,6 m	3H, 8,5 sl	---	---	---
TS4	NH ₂	NO ₂	H	2H, 8,2-8,3 m	1H, 10,2 s	3H, 2,2 s	1H, 7,0 d, J=9,0 1H, 8,2-8,3 m 1H, 7,9 s	2H, 7,7 s	---	---	---
TS5	NO ₂	NH ₂	H	1H, 7,9 s 1H, 8,5 s	1H, 10,4 s	3H, 2,2 s	1H, 7,3 dd, J=2,0; 9,2 1H, 7,9 d, J=9,2 1H, 7,4 d, J=2,0	2H, 7,4 s	---	---	---
TS6	H	NO ₂	H	2H, 8,4-8,5 m	1H, 10,4 s	2H, 4,0 s	2H, 7,8 m 1H, 8,3 ddd, J=3,0; 3,2 e 6,4 1H, 8,3 dd, J=1,6 e 3,0	3H, 8,4-8,5 m	---	---	---
TS7	H	H	H	1H, 7,9 s 1H, 8,3 s	1H, 10,2 s	3H, 2,3 s	2H, 7,9 m 3H, 7,4 m	---	---	---	---
TS8	H	NO ₂	H	1H, 8,1 s 1H, 8,4 s	1H, 10,4 s	3H, 2,4 s	1H, 8,2 ddd, J=2,2; 2,2 e 8,0 1H, 7,7 t, J=8,0 1H, 8,4 ddd, J=2,2; 2,2 e 8,0 1H, 8,6 t, J=2,2	---	---	---	---
TS10	NO ₂	H	OH	1H, 8,2 s 1H, 8,6 s	1H, 11,0 s	2H, 4,8 d J=5,3	4H, 8,2 s	---	1H, 6,1 t J=5,3	---	---
MTS9	NO ₂	H	NH-(C=O)- CH ₂ H ₄ CO ₂ H	2H, 8,1-8,3 m	1H, 8,5 s	2H, 4,3 d J=6,0	4H, 8,1-8,3 m	1H, 8,8 t J=6,0	---	4H, 2,3-2,5 m	1H, 11,1 s
MTS10	NO ₂	H	O-(C=O)- CH ₂ H ₄ CO ₂ H	1H, 8,1-8,2 m 1H, 8,3 s	1H, 8,6 s	2H, 5,3 s	4H, 8,1-8,2 m	---	---	4H, 2,4-2,5 m	1H, 10,9 s

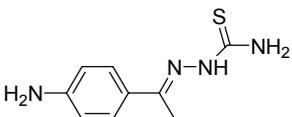
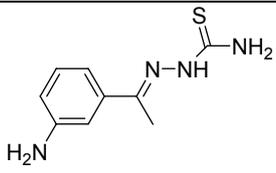
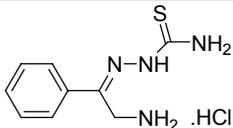
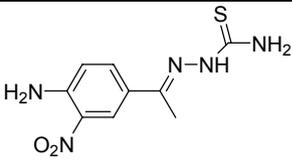
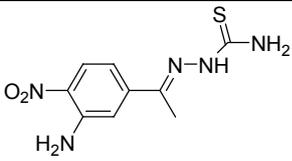
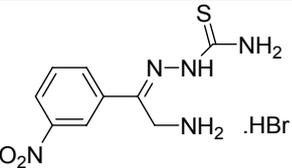
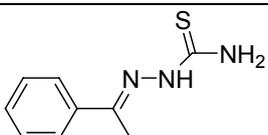
Tabela 1.4: Deslocamento químico e atribuições para o composto hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (**MTS9**)

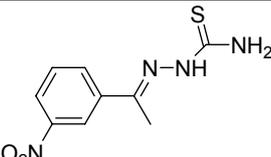
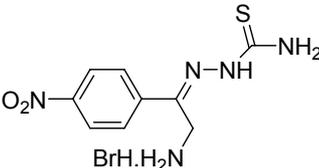
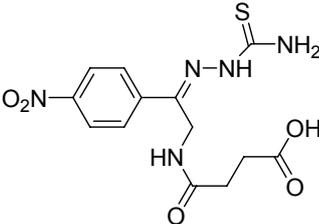
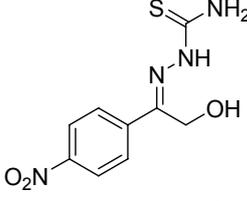
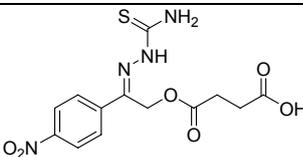
Grupo	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	gHMBC
-NH ₂	2H, 8,11-8,26 m	---	179,36
>C=S	---	179,36	---
-NH-	1H, 8,52 s	---	179,36
>C=N-	---	144,30	---
1	---	142,32	---
2	4H, 8,11-8,26 m	128,04	123,20; 128,04; 142,32; 144,30; 147,44
3		123,20	
4	---	147,44	---
-CH ₂ -	2H, 4,33 d $J=6,0$	34,51	142,32; 144,30; 172,45
-C(O)NH-	1H, 8,77 t $J=6,0$	---	34,51; 172,45
-C=O-NH-	---	172,45	---
-CH ₂ -CH ₂ -	4H, 2,31-2,46 m	29,58 e 28,94	29,58; 28,94; 173,55
-C=O-OH	---	173,55	---
-C(O)OH	1H, 11,13 s	---	144,30; 179,36

1.4.4. Teste *In Vitro* de Atividade Tripanocida

Os resultados do ensaio de atividade tripanocida *in vitro* contra cepas Y de *T. cruzi* estão resumidos na tabela 1.5.

Tabela 1.5: Porcentagem de parasitas mortos para cada concentração empregada dos compostos ensaiados contra *T. cruzi*

composto	100 µg/mL	50 µg/mL	25 µg/mL	10 µg/mL	5 µg/mL	2,5 µg/mL	1 µg/mL	IC50 µg/mL (µM)
 TS1	3%	---	---	---	---	---	---	---
 TS2	46%	28%	---	---	---	---	---	---
 TS3	30%	1%	---	---	---	---	---	---
 TS4	---	---	---	---	---	---	---	---
 TS5	75%	42%	14%	5%	---	---	---	60,60 (293,0)
 TS6	27%	3%	---	---	---	---	---	---
 TS7	91%	62%	30%	5%	---	---	---	37,68 (195,0)

 TS8	48%	46%	43%	16%	3%	---	---	---
 TS9	100%	100%	100%	97%	83%	53%	23%	2,13 (6,4)
 MTS9	99%	98%	85%	76%	54%	30%	15%	4,25 (12,0)
 TS10	100%	100%	92%	51%	8%	2%	1%	9,59 (37,7)
 MTS10	89%	55%	38%	23%	11%	8%	---	41,09 (116,0)

Embora o número de compostos sintetizados ser relativamente pequeno, é possível abstrair algumas informações acerca de estrutura *versus* atividade nestes compostos em diversos aspectos. Notoriamente, os 4 compostos de maior atividade apresentam grupamento nitro em posição *para* no anel aromático, é o caso dos compostos TS9, TS10, MTS9 e MTS10, e ainda todos os compostos que apresentam grupo nitro em posição *meta* no anel foram menos ativos que seus isômeros em *para* ou mesmo sem este grupo, tal como os pares TS4 (inativo) e TS5 ($IC_{50}=60,60 \mu\text{g/mL}$), TS6 (3% inibição a $50 \mu\text{g/mL}$) e TS9 ($IC_{50}=2,13 \mu\text{g/mL}$), e TS8 (3% inibição a $5 \mu\text{g/mL}$) e TS7 ($IC_{50}=37,68 \mu\text{g/mL}$).

A posição do grupamento amina também interfere grandemente na atividade biológica dos compostos, observa-se que este grupo não é bem tolerado no anel aromático, porém é mais aceito na cadeia lateral, o que é observado comparando-se o composto TS9 com TS5, onde o primeiro foi muito mais ativo que o segundo. Quando o grupo amínico está no anel, ele é mais bem tolerado em posição *meta* (TS5 e TS2) do que em *para* (TS4 e TS1), porém o ideal parece ser a ausência deste grupamento na molécula, visto o composto TS7 apresentar uma atividade superior ao composto TS3. No entanto o efeito prejudicial dado pela amina é revertido quando o grupo nitro está presente em posição *para* no anel, exceto no caso da TS5, que apresenta uma amina aromática, sendo menos ativo que o composto TS7, onde os grupos nitro e amina estão ausentes na molécula.

Comparando-se os compostos TS9, TS10, MTS9 e MTS10 observa-se que quando a cadeia lateral apresenta um substituinte há uma preferência por substituintes de menor peso molecular e mais hidrogenados ($-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$) do que aqueles maiores e menos hidrogenados ($-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-\text{R}$ e $-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{R}$).

Desta forma, podemos estabelecer algumas relações estrutura x atividade: 1º. grupo Nitro aromático: posição *para* > ausente > posição *meta*; 2º. Grupo amina: alifática > aromática em *meta* > aromática em *para*, e 3º. Cadeia lateral: $-\text{CH}_3$ > $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ > $-\text{CH}_2-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-\text{R}$ > $-\text{CH}_2-\text{OH}$ > $-\text{CH}_2-\text{O}(\text{C}=\text{O})-\text{R}$.

Uma vez que o objetivo deste trabalho foi a obtenção de compostos ativos e com grupamento químico passível de sofrer derivatização, o composto TS9 cumpriu as expectativas apresentando-se bastante ativo ($\text{IC}_{50}=6,4 \mu\text{M}$), quando comparado ao benznidazol ($\text{IC}_{50}=34,6 \mu\text{M}$), além de possuir grupo amina primária, na qual é bastante reativa para uma posterior obtenção de um derivado deste composto.

1.4.5. Ensaio de mutagenicidade - Teste do micronúcleo

Uma vez selecionados os 3 compostos de maior atividade (TS9, MTS9 e TS10), realizou-se a avaliação da genotoxicidade destes através do teste de micronúcleo. Este ensaio foi realizado apenas com 3 compostos pois, por empregar 10 camundongos para cada dose de cada composto, seria necessário a utilização de uma quantidade muito grande de animais para avaliar todos aqueles que apresentaram alguma atividade *in vitro* contra *T. cruzi*.

Os resultados encontrados a partir da análise citológica contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os fármacos encontram-se na tabela 1.6, onde podemos verificar as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento.

Tabela 1.6. Número de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (SD)

Tratamentos (mg/Kg p.c.)	Animais										Média	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Control +	44	31	53	49	22	47	66	68	38	52	47	14,29
Control -	2	0	1	2	1	0	1	1	0	0	0,8	0,78
Control água	1	0	1	0	2	1	1	0	1	0	0,7	0,67
benznidazol												
100	3	7	4	9	4	6	4	6	1	4	4,8	2,25
TS9												
50	2	1	0	2	2	1	1	1	2	3	1,05	0,85
100	3	2	3	2	4	2	0	2	2	2	2,2	1,03
250	1	3	2	3	5	4	3	8	4	4	3,7	1,89
TS10												
50	1	3	0	4	5	1	3	0	1	1	1,9	1,73
100	1	4	1	4	4	3	0	1	3	1	2,2	1,55
250	4	3	2	5	0	4	2	0	3	0	2,3	1,83
MTS9												
50	2	2	1	2	2	2	2	3	4	5	2,5	1,18
100	2	3	1	6	1	2	3	4	3	2	2,7	1,49
250	3	2	3	4	1	5	3	2	2	3	2,8	1,14

Control + (Controle Positivo): ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.; Control - (Controle Negativo): CMC (1%)/Tween (0,2%)

Com base nos resultados mostrados na tabela 1.6, realizou-se a comparação entre as médias encontradas baseando-se no teste T estatístico, com nível de significância de 5%. As médias foram testadas sempre de duas em duas, a tabela 1.7 traz uma matriz contendo todos os valores P calculados.

Por ser o único fármaco atualmente disponível no mercado, o benznidazol foi adicionado a este ensaio como referência de genotoxicidade do que é hoje aceito para o tratamento da doença. A comparação foi feita numa única dosagem de 100 mg/Kg p.c., onde todos os grupos tratados apresentam diferença significativa do controle negativo (tabela 1.7). Na figura 1.16 vemos o histograma das frequências encontradas para cada um dos tratamentos realizados.

Tabela 1.7. Matriz valor P (Teste T, $\alpha=0,05$)

	C +	C -	C água	BDZ**	TS9 (mg/Kg p.c)			TS10 (mg/Kg p.c)			MTS9 (mg/Kg p.c)		
					50	100	250	50	100	250	50	100	250
C +	---	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
C -	<0,001	---	0,764	<0,001	0,072	0,003	<0,001	0,084	0,020	0,028	0,001	0,002	<0,001
C água	<0,001	<0,001	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
BDZ **	<0,001	<0,001	---	---	---	0,002	---	---	0,008	---	---	0,024	---
TS9 (mg/Kg p.c)													
50	<0,001	0,072	---	---	---	---	---	0,520	---	---	0,043	---	---
100	<0,001	0,003	---	0,002	---	---	---	---	1,000	---	---	0,396	---
250	<0,001	<0,001	---	---	---	---	---	---	---	0,109	---	---	0,213
TS10 (mg/Kg p.c)													
50	<0,001	0,084	---	---	0,520	---	---	---	---	---	0,376	---	---
100	<0,001	0,020	---	0,008	---	1,000	---	---	---	---	---	0,472	---
250	<0,001	0,028	---	---	---	---	0,109	---	---	---	---	---	0,472
MTS9 (mg/Kg p.c)													
50	<0,001	0,001	---	---	0,043	---	---	0,376	---	---	---	---	---
100	<0,001	0,002	---	0,024	---	0,396	---	---	0,472	---	---	---	---
250	<0,001	<0,001	---	---	---	---	0,213	---	---	0,472	---	---	---

* Valores em negrito significa não haver diferença significativa entre as médias

** BDZ (benznidazol na concentração de (100 mg/Kg p.c)

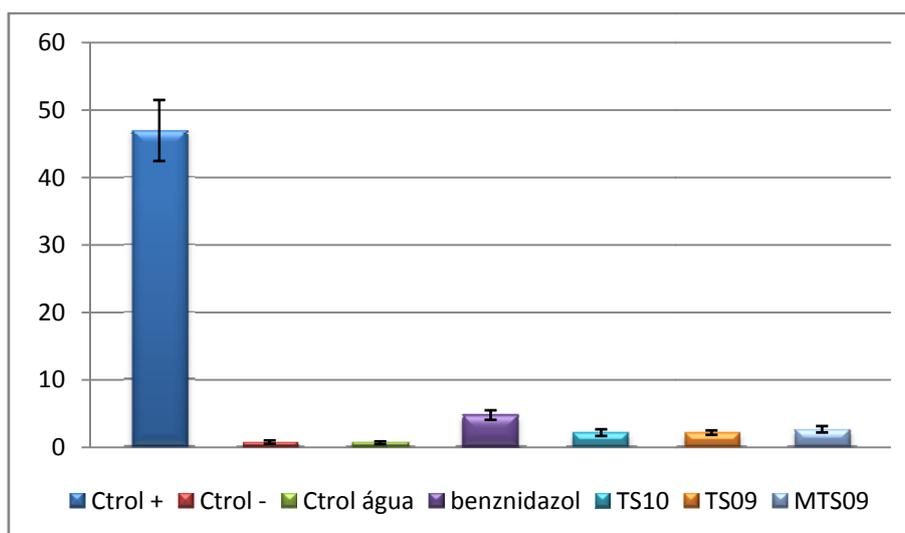


Figura 1.16. Histograma da frequência média (+/- erro padrão) de reticulócitos micronucleados para 1000 células obtidas de camundongos tratados na dose de 100 mg/Kg p.c.

O fármaco benznidazol apresentou-se mais genotóxico do que os demais compostos testados nesta dosagem (tabela 1.6). Nas demais doses estudadas, não foi possível verificar uma diferença na atividade genotóxica entre os 3 compostos estudados, o que significa que todos apresentam atividade similar e muito inferior ao controle positivo. Na dose de 50 mg/Kg p.c. todos os compostos apresentaram genotoxicidade semelhante à encontrada para o controle negativo (tabela 1.6 e figura 1.17).

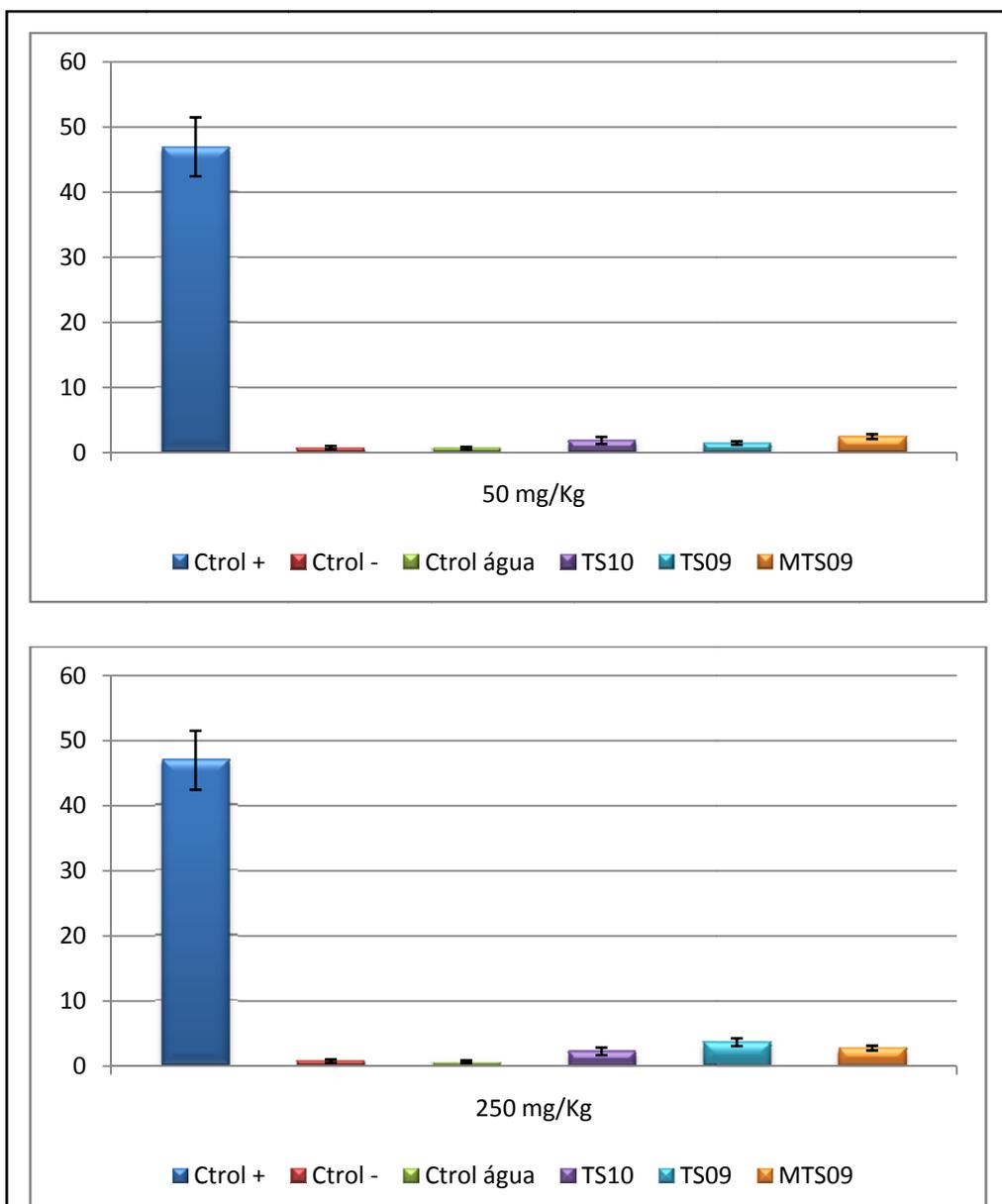


Figura 1.17: Histogramas da frequência média (+/- erro padrão) de reticulócitos micronucleados para 1000 células obtidas de camundongos tratados nas doses de 50 mg/Kg p.c. (superior) e 250 mg/Kg p.c. (inferior)

Encontram-se na figura 1.18 os histogramas obtidos para cada tratamento isolado, nas diversas dosagens administradas. Observa-se que em todos os casos os compostos apresentaram-se muito menos genotóxico que o controle positivo, o que demonstra a baixa atividade genotóxica destas moléculas.

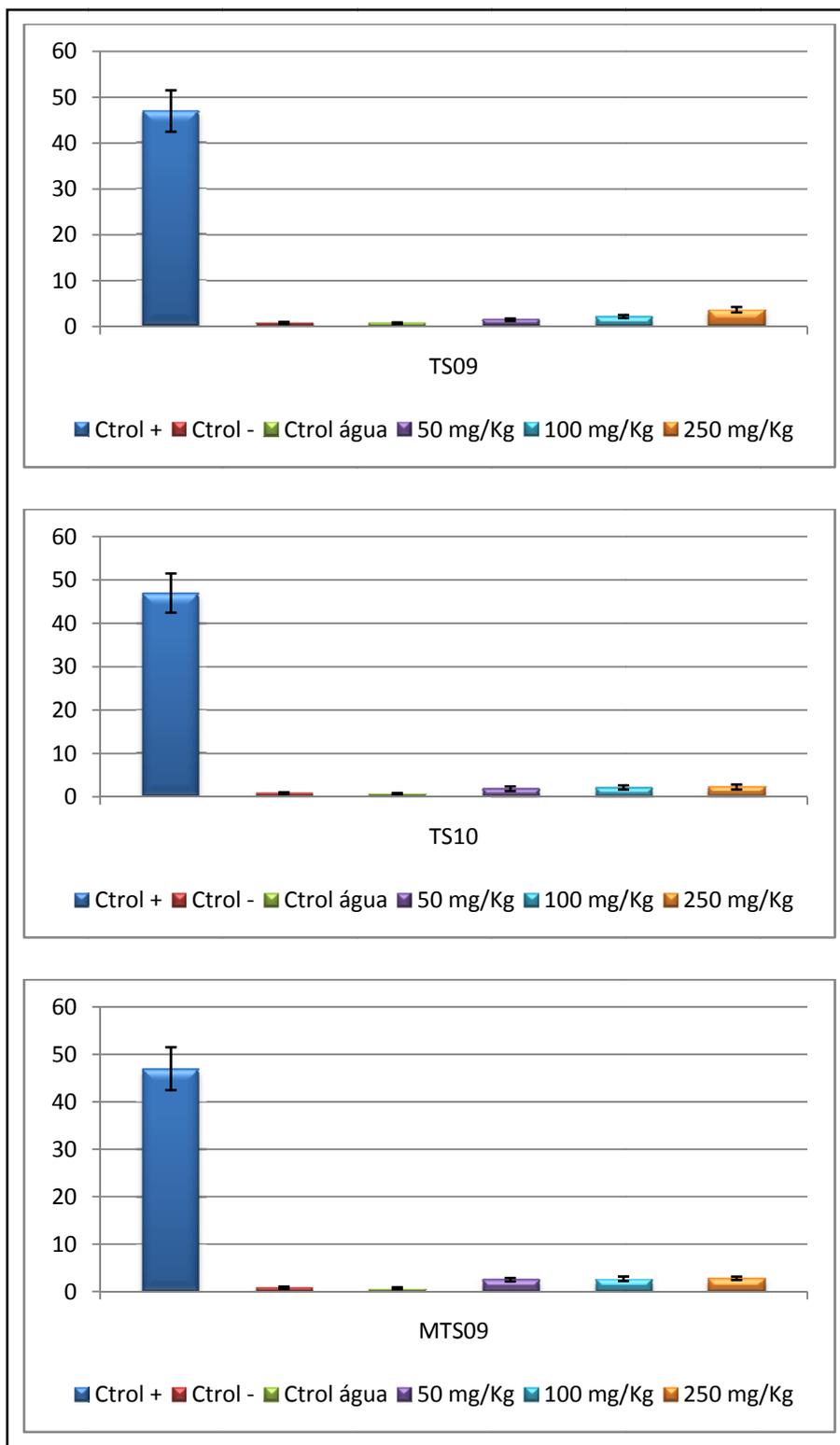


Figura 1.18: Histogramas da frequência média (+/- erro padrão) de reticulócitos micronucleados para 1000 células obtidas de camundongos tratados nas diversas dosagens para cada tratamento

1.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Através das metodologias sintéticas apresentadas, foi possível sintetizar e caracterizar os compostos propostos, e assim, obter derivados de comprovada atividade tripanocida e com grupo amínico ou hidroxílico ou hemissuccínico de fácil derivatização.

Com base nos resultados da atividade tripanocida *in vitro*, pode-se observar a importância da presença do grupo nitro nestas estruturas, assim como a influência negativa da presença de grupo amina aromática para esta atividade.

A partir dos 3 compostos de maior atividade biológica, testou-se a mutagenicidade destes no Teste de Micronúcleo, sugerindo uma baixa atividade mutagênica dos compostos. A mutagenicidade foi ainda menor que a encontrada no único fármaco utilizado hoje no Brasil contra a Doença de Chagas, o benznidazol.

Serão realizados mais ensaios para avaliar o potencial mutagênico destas moléculas, como o Teste de Ames e também para avaliar a toxicidade e atividade *in vivo*.

Estes três compostos poderão ser derivatizados em sua cadeia lateral, gerando compostos híbridos ou Sistemas Fármaco-Dirigido, podendo-se assim aumentar a potência ou a especificidade ou diminuir a toxicidade.

CAPÍTULO 2

OBTENÇÃO DE NANOANTICORPOS

2.1. INTRODUÇÃO

2.1.1. Utilização de Anticorpos na Terapêutica

O *T. cruzi* é um parasita eucarionte bem adaptado que apresenta um alto nível de variabilidade genotípica, e sua multiplicação nos tecidos do hospedeiro divide com as células cancerígenas uma característica marcante, a capacidade para a rápida divisão celular. Surpreendentemente, doenças parasitárias e câncer compartilham estratégias semelhantes de escape do sistema imunológico. Essas alterações imunológicas devem ser adicionadas para avaliação da patogenia e na terapêutica, para se buscar alternativas a fim de reduzir respostas imunes não específicas, contribuindo para um controle melhor da infecção (OUAISSI; OUAISSI, 2005; CHAMOND; et al., 2002).

2.1.2. Anticorpo Monoclonal

O conceito da tecnologia de anticorpo monoclonal (AMC), também denominado tecnologia de hibridoma, foi introduzido por Köhler e Milstein (1975), utilizando linhagens de células de camundongo que secretam um único tipo de anticorpo com uma especificidade única ao antígeno (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Esta tecnologia permitiu a produção de anticorpos monoclonais utilizando como antígenos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. A disponibilidade destes anticorpos monoclonais de camundongo (murínico) abriu caminho para aprimoramento de diagnósticos e da terapêutica. Contudo a ampliação da aplicação de anticorpos monoclonais sofre severas limitações, como o custo elevado para produção e expressão em sistemas mamíferos, inabilidade para aperfeiçoar estes anticorpos utilizando técnicas de engenharia genética e, sobretudo, pelo potencial imunogênico de anticorpos de camundongo quando administrado em humanos (KUUS-REICHEL; et al., 1994).

Para corrigir estas limitações, alguns métodos foram desenvolvidos (figura 2.1):

1. Na década de 90, avanços na biologia molecular permitiram o emprego de *Escherichia coli* para produção de anticorpos recombinantes não somente expressos em células bacterianas contendo fagomídeos (vetores híbridos de bactéria e fago), tecnologia denominada de “ Phage display”, permitindo mais rapidez na seleção e maior produção de anticorpos específicos (CARMEN; JERMUTUS, 2002).
2. Anticorpos quiméricos que combinam fragmentos de regiões variáveis de camundongo com regiões constantes humanas (BOULIANNE; et al., 1984);
3. Anticorpos humanizados que são inteiramente humanos, exceto pelas regiões de ligação com antígeno CDRs de origem de camundongo (RIECHMANN; et al., 1988), e
4. Anticorpos humanos desenvolvidos a partir de camundongos transgênicos produtores de anticorpos inteiramente humanos (KELLERMANN; GREEN, 2002).

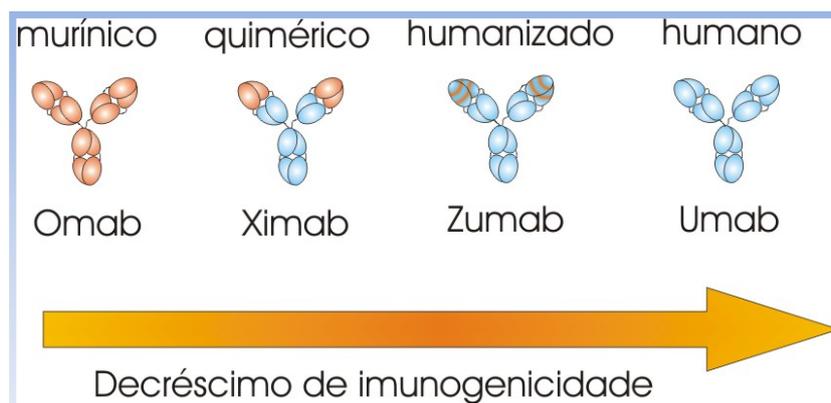


Figura 2.1: Tipos de anticorpos e potencial imunogênico

Os anticorpos monoclonais são proteínas que possuem uma grande massa molecular média de aproximadamente 150 kDa. Geralmente AMCs possuem uma moderada atividade citotóxica e são frequentemente utilizados em associação com agentes antineoplásicos. Mesmo nos casos que anticorpos não conjugados possuam boa atividade, um artifício utilizado é a conjugação a isótopos radioativos como, por exemplo, em Zevalin e Bexxar (CHARI, 2008).

A tabela 2.1 traz um prospecto deste crescente mercado de vendas globais acima de 20 bilhões de dólares. Os nomes genéricos dos AMCs seguem regras de nomenclatura, eles sempre terminam em “mab” indicando serem anticorpos monoclonais, as letras que precedem esta terminação indicam a fonte genética: a letra “o” significa origem murínica e “u” humana, as letras “xi” quimérica e “zu” humanizada. (REICHERT; VALGE-ARCHER, 2007).

Tabela 2.1: Anticorpos monoclonais aprovados para uso em humanos

Nome genérico	Nome comercial	Origem	Primeira indicação aprovada	Ano de aprovação
muromomab-CD3	Orthoclone Okt3	murínica	Prevenção de rejeição de transplante de rim	1986
abciximab	Reopro	quimérica	Prevenção de coágulo sanguíneo em angioplastia	1994
rituximab	Rituxan	quimérica	Linfoma não Hodgkin	1997
daclizumab	Zenapax	humanizada	Prevenção de rejeição de transplante de fígado	1997
basiliximab	Simulect	quimérica	Prevenção de rejeição de transplante de fígado	1998
palivizumab	Synagis	humanizada	Prevenção de infecção respiratória virótica	1998
infiximab	Remicade	quimérica	Doença de Chron	1998
trastuzumab	Herceptin	humanizada	Câncer de mama	1998
alemtuzumab	Campath-1H	humanizada	Leucemia mielóide crônica	2001
ibritumomab tiuxetan	Zevalin	murínica	Linfoma não Hodgkin	2002
adalimumab	Humira	humana	Artrite reumatóide	2002
omalizumab	Xolair	humanizada	Asma	2003
tositumomab-I131	Bexxar	murínica	Linfoma não Hodgkin	2003
efalizumab	Raptiva	humanizada	Psoríase	2003
cetuximab	Erbitux	quimérica	Câncer coloretal	2004
bevacizumab	Avastin	humanizada	Câncer coloretal	2004
natalizumab	Tysabri	humanizada	Esclerose múltipla	2004
ranibizumab	Lucentis	humanizada	Degeneração macular	2006
panitumumab	Vectibix	humana	Câncer coloretal	2006
eculizumab	Soliris	humanizada	Hemoglobinúria paroxística noturna	2007
certolizumab pegol	Cimzia	humanizada	Doença de Chron	2008

2.1.3. Sistema Conjugado Fármaco-Anticorpo

O Sistema Conjugado Fármaco-Anticorpo é um tipo de pró-fármaco denominado fármaco dirigido. Os transportadores utilizados nesta forma latente são capazes de transportar os fármacos seletivamente do local de administração até o sítio de ação (receptores específicos) e no local de ação ou próximo dele ocorre a liberação da porção ativa. O objetivo principal do fármaco dirigido é minimizar as reações adversas provocadas pela ação inespecífica do fármaco em outros alvos, diminuindo, portanto, a toxicidade (CHUNG; FERREIRA, 1999).

Os transportadores mais interessantes utilizados nesta forma latente são aqueles que interagem especificamente com os sítios presentes na superfície das células-alvo. Os fármacos podem ser ativados após a endocitose do conjugado fármaco-transportador pela própria célula alvo mediante ação de hidrolases ácidas presentes no compartimento lisossômico intracelular (CHUNG; FERREIRA, 1999).

Os transportadores macromoleculares como anticorpos monoclonais, albumina, lecitinas, hormônios peptídicos e glicoproteínas são os mais empregados com o objetivo de se obter formas latentes altamente seletivas (CHUNG; FERREIRA, 1999).

O Sistema Fármaco-Anticorpo Conjugado torna-se interessante na medida em que o anticorpo, apesar de possuir uma ótima afinidade ao antígeno, não é suficientemente citotóxico e o fármaco altamente citotóxico não é seletivo e ainda pode possuir uma baixa biodisponibilidade. Neste sistema, três componentes são imprescindíveis: o anticorpo monoclonal, o agente citotóxico e o agente ligante que conecta o anticorpo ao fármaco. (CHARI, 2008).

Preferivelmente um conjugado fármaco-anticorpo deve permanecer inativo na circulação sanguínea até que alcance seu alvo, após isto, deve ser internalizado por endocitose mediada por receptor e finalmente, dentro da célula alvo ocorre a quebra da ligação entre o fármaco e o anticorpo. A ligação ocorre na amina da cadeia lateral de lisinas. Existem cerca de 80 lisinas em um anticorpo, apenas 10 são acessíveis para formação de uma ligação, mas, em média, 4 moléculas de fármaco são ligadas ao

anticorpo, pois a ligação de um número maior é impossibilitada devido a insolubilidade da maioria dos fármacos citotóxicos no meio aquoso que é utilizado para manutenção do anticorpo em solução e também um grande número de moléculas ligadas pode alterar a farmacocinética do anticorpo *in vivo* ou diminuir a afinidade com seu antígeno (CHARI, 2008).

O anticorpo selecionado para este sistema deve se ligar seletivamente às células alvo e não deve interagir com outros tipos celulares, ter alta afinidade e o seu antígeno e possuir uma alta expressão na superfície da célula alvo e anticorpos murínicos devem ser trocados por formas menos imunogênicas (formas humanizadas) (CHARI, 2008).

Os agentes citotóxicos devem ter as seguintes propriedades: alta potência *in vitro* com IC₅₀ de 0,01 – 0,1 nM frente a linhagem de células tumorais, um grupo funcional capaz de sofrer derivatização para ligação com o anticorpo e é desejável que estes agentes possuam uma solubilidade em água razoável e uma estabilidade prolongada neste meio que é comumente empregado para anticorpos (CHARI, 2008).

O agente ligante deve ser escolhido de modo a proporcionar estabilidade na circulação sanguínea, mas permitindo a liberação do fármaco rapidamente dentro das células alvo e por último, esse conjugado deve permanecer estável em solução aquosa para permitir formulações para administração endovenosa (CHARI, 2008).

Os três tipos de agentes ligantes mais empregados são: ligantes lábeis a ácido, ligantes lábeis a peptidase e ligantes dissulfídicos. Os ligantes dissulfídicos apresentam como vantagens a estabilidade em pH fisiológico, uma quantidade de glutatona reduzida, que é responsável pela cisão de ligações dissulfídicas, em quantidade milimolar dentro de células cancerígenas enquanto que na circulação sanguínea está presente em uma concentração micromolar (ELIAS; et al., 1990; MEISTER; ANDERSON, 1983).

O mais bem sucedido conjugado fármaco-anticorpo é o conjugado de anticorpo humanizado anti-CD33 e caliqueamicina, denominado Mylotarg (figura 2.2), para o

tratamento de leucemia mielóide aguda, o seu sucesso abriu caminho para pesquisa de inúmeros outros anticorpo-fármaco conjugados e muitos destes se encontram em estudos de fase clínica com excelentes resultados (OLSON; et al., 2007; ROSS; et al., 2006).

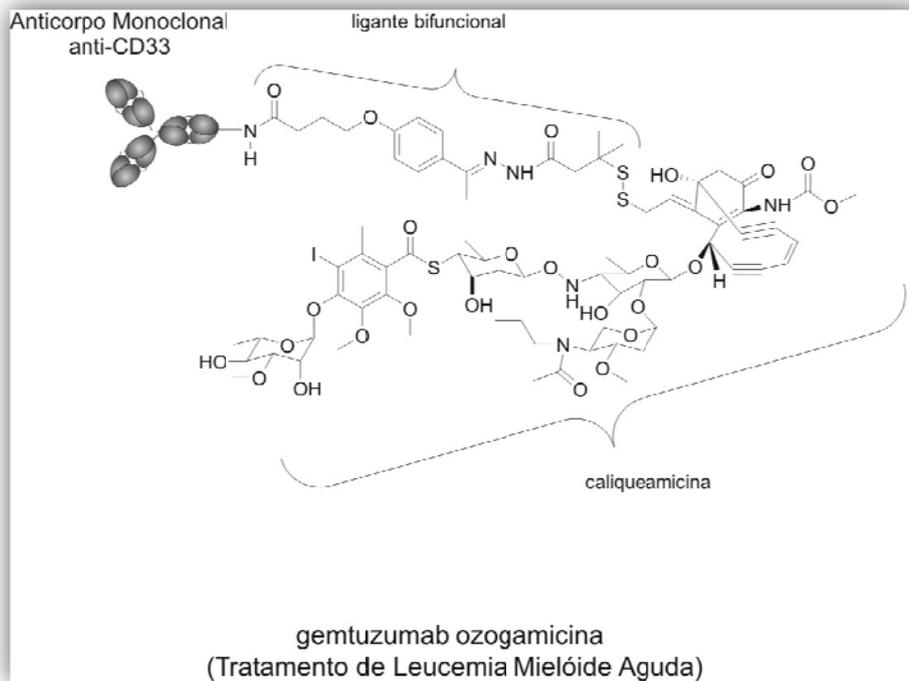


Figura 2.2: Estrutura do Mylotarg (gemtuzumab ozogamicina)

2.1.4. Anticorpos Biespecíficos

Consiste na junção de dois fragmentos de anticorpos construídos por tecnologia de DNA recombinante ou fusão de células. Um fragmento de anticorpo biespecífico $F(ab')_2$ que se liga ao antígeno CD30, encontrado na superfície de células Hodgkin e Reedsternberg, e ao CD16, receptor ativante de células NK exterminadoras naturais como neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares, monócitos e macrófagos, foi testado para o tratamento da Doença de Hodgkin. Estudo de fase clínica demonstrou resposta antitumoral objetiva de 25% com uma remissão completa e três remissões parciais (HARTMAN; et al., 2001).

2.1.5. Nanoanticorpos de Camelídeos VHH

Muydermans *et al.* (1993) descobriram que dromedários e lhamas (camelídeos) possuem um tipo único de anticorpo isento de cadeia leve e de CH1, tendo, portanto uma menor massa molecular (figura 2.3). Como a cadeia leve é ausente este anticorpo se liga ao antígeno específico por um único domínio de cadeia pesada denominado pelo autor de VHH. O VHH possui vantagens quando comparado a Fv (fragmento variável), ou scFv (fragmento variável de cadeia simples) como facilidade de obtenção, pois apenas um domínio tem que ser clonado e expressado, resultando em altos rendimentos e fácil purificação, altamente solúvel e estável, possui uma alta afinidade ao antígeno, e é altamente difundível em tecidos. Além dessas vantagens apresenta uma homologia semelhante a fragmentos VH (cadeia pesada variável) humanos e baixa imunogenicidade (HAMERS-CASTERMAN; *et al.*, 1993; HOELZER; *et al.*, 1998; NGUYEN; *et al.*, 2001; MUYLDERMANS, 2001). Todas estas qualidades sugerem que estes fragmentos possam desempenhar melhor papel em diagnóstico e na terapêutica que anticorpos convencionais e seus fragmentos.

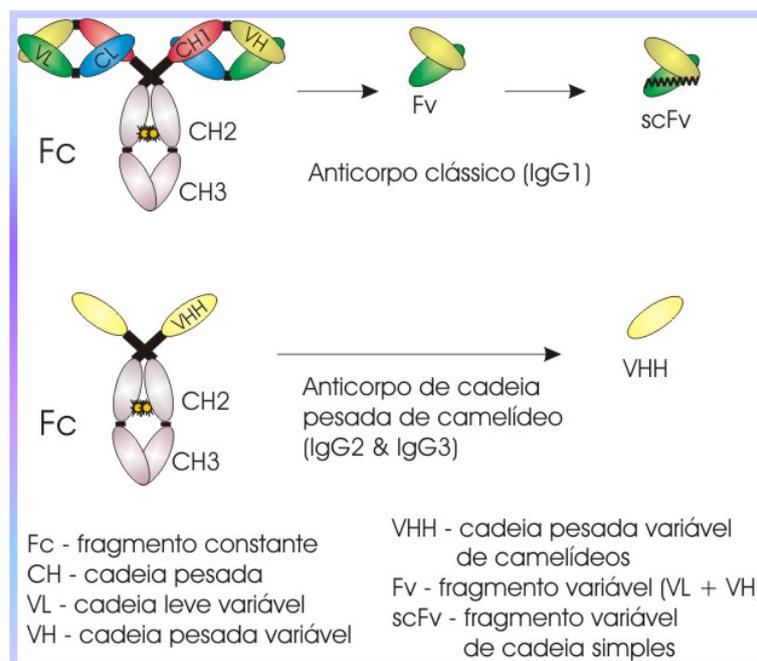


Figura 2.3: Estruturas do anticorpo clássico e do anticorpo de cadeia pesada de camelídeo

2.2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi a obtenção de nanoanticorpos anti-transialidase, derivados de *Camelidae* que se ligam a antígenos de transialidase (TS) e da glicoproteína recombinante J-18.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Materiais

2.3.1.1. Obtenção de Nanoanticorpos Anti-Transialidase e Anti-J-18

Extração dos linfócitos

Água livre de RNase por tratamento com DEPC (dietilpirocarbonato); lymphoprep (Nycomed), e Tampão A (para 100 mL: tiocianato de guanidina- 47,20 g; ácido cítrico- 0,74 g; lauril sarcosina- 0,50 g).

Preparação do cDNA

tampão (5X Superscript II RNase H⁻ kit transcriptase reversa); DTT (ditiotretitol); dNTPs (bases nitrogenadas); HPRI (inibidor de RNase placentária humana, 40 U/ µL), e detrascriptase (200 u/ µL).

Construção da biblioteca de VHH no vetor pHEN4

primers CALL001 (GTC.CTG.GCT.CTT.CTA.CAA.GG) e CALL002 (GGT.ACG.TGC.TGT.TGA.ACT.GTT.CC); Taq polimerase (5U/ µL); dNTPs 20mM (5mM de cada dNTP); gel de agarose 1% com brometo de etídeo; tampão TBE para eletroforese; kit de extração em gel (Qiaquick PCR); primers A6E (GAT.GTG.CAG.CTG.CAG.GAG.TCT.GGA/G.GGA.GG) e FR4FOR (GGA.CTA.GTG.CGG.CCG.CTG.GAG.ACG.GTG.ACC.TGG.GT); enzimas de restrição PstI e NotI (Roche); enzima T4 ligase (5U/µL); tampão 10x ligation; meio SOB (para 100 mL: peptona- 2g; extrato de levedura- 0,5 g- NaCl 2M-0,5 mL; KCl 250 mM- 1 mL); meio SOC (a partir de 25 mL de meio SOB, adicionar: glicose a 20%- 500 µL; MgSO₄- 250 µL; MgCl₂- 125 µL), e placa de petri com meio LB-ágar (glicose 2% e ampicilina); meio LB (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl e 1,5% de ágar).

Panning (Etapa de seleção de nanoanticorpos específicos)

Meio 2xTY (para 1L: triptona/peptona-16 g; levedura- 10 g; NaCl- 5g); PBS (solução tampão de fosfato); IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo).

Inserção dos genes do VHH no vetor pBAD/gIII

Solução S1 (glicose 50 mM, Tris 25mM e EDTA 10 mM), solução S2 (NaOH 0,2M e SDS 1%, solução S3 (acetato de potássio 3M e ácido acético 5M), Taq polimerase (5U/ μ L) (Roche), tampão de PCR 10 vezes concentrado (Roche), Fwd pBAD NcoI, Rev pBAD Sall, enzima NcoI (Roche), enzima Sall (Roche), L-arabinose, enzima T4 ligase (5U/ μ L), tampão 10x ligation e meio RM (Para 1L de solução: 6g de Na₂HPO₄, 3g de KH₂PO₄, 0,5g de NaCl, 1g de NH₄Cl e 90mL de água, 1mL de MgCl₂ 1M, 10 mL de glicose 20% 1 mL de ampicilina 100 mg/mL)

2.3.2. Métodos

Os procedimentos experimentais detalhados estão descritos no Anexo B (pg.138).

2.3.2.1. Obtenção de Nanoanticorpos Anti-Transialidase e Anti-J-18

Amostras dos antígenos transialidase (TS) e J-18 foram cedidos pela Profa. Dra. Nobuko Yoshida da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo), Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Parasitologia. Enquanto a TS trata-se da enzima em sua totalidade, o antígeno J-18 é uma proteína recombinante derivada de gp82 fundida a glutathione S-transferase. Os antígenos foram enviados para o Laboratório Central de pesquisa veterinária em Dubai (Emirados Árabes Unidos), onde foram inoculadas em dromedário.

A obtenção dos clones que continham o vetor pHEN4 com os genes dos anticorpos anti-transialidase e anti-J18 foi realizada por mim no Instituto de Biotecnologia da Universidade Livre de Bruxelas, sob coordenação do Prof. Dr. Serge Muyldermans, em Bruxelas (Be) durante um período de cinco meses e meio. A posterior troca para vetor de expressão, pBAD/gIII, foi realizada no Laboratório de Parasitologia (UNIFESP), sob coordenação da Profa. Dra. Nobuko Yoshida e do Doutor Rafael Miyzawa Martins durante 3 meses.

A partir do sangue imunizado de dromedário coletado após 45 dias, extraíram-se os linfócitos e preparou-se o cDNA a partir de seu material genético (RNA). O material foi amplificado utilizando 2 primers, call 001 e call 002. Um anela-se a região constante 1 dos VHHs ou de VHs convencionais, enquanto o outro se anela a região CH2, dando origem a dois tipos de fragmentos: VH-CH1-CH2 (900 pares de bases) e o que contém o VHH (600 pares de bases). Através de purificação em gel de agarose foi removido o fragmento referente a 900 pares de bases. Uma nova amplificação dos fragmentos de 600 pares de bases foi realizada, utilizando os primers A6E e FR4FOR, para introduzir os sítios de restrições das enzimas PstI e NotI que foram úteis para inserção no vetor. Estes fragmentos foram então inseridos no vetor pHEN4, criando-se assim uma biblioteca de genes VHH em *E. coli* TG1 (figura 2.4).

Através de técnica de panning, selecionou-se dentre as colônias de células TG1 os clones antígeno-específicos, que continham os anticorpos desejados.

Após selecionados os clones, os genes que continham os anticorpos foram amplificados por PCR e seus nucleotídeos sequenciados.

Uma nova amplificação foi realizada a esses fragmentos para inserção de sítios de restrição de diferentes enzimas para incorporação em outro vetor. Os DNAs dos anticorpos foram digeridos, assim como o vetor de expressão pBAD/gIII, e seus fragmentos foram ligados e expressos em colônias expressantes a fim de se obter os nanoanticorpos.

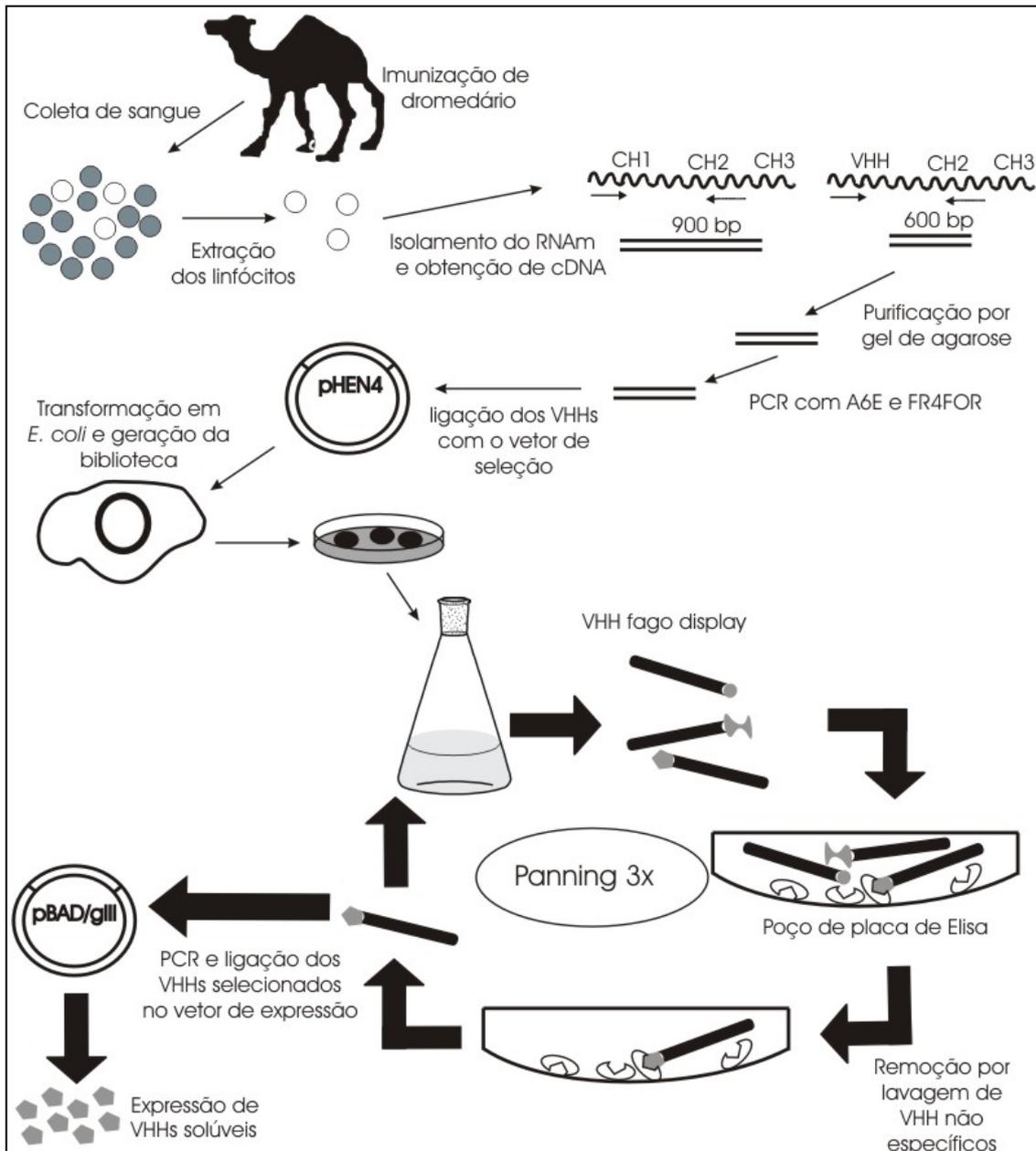


Figura 2.4: Método geral para obtenção de VHHs

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Obtenção de Nanoanticorpos Anti-Transialidase e Anti-J-18

A imunização foi realizada em dromedário, os dois antígenos foram inoculados no mesmo animal. A enzima TS apresentou uma elevada imunogenicidade, enquanto que a J-18 foi apenas moderada. A partir dos linfócitos foi possível extrair os mRNAs e destes produzir cDNA para posterior elaboração da biblioteca de VHH no vetor pHEN4 através da tecnologia denominada “phage display library” que permite a construção de uma biblioteca de anticorpos ou polipeptídeos apresentada nos capsídeos de fagos filamentosos, sendo considerada portanto, a interface entre genótipo e fenótipo para seleção de anticorpos ou proteínas de interesse (CARMEN; JERMUTUS, 2002).

Esta seleção (panning) só foi possível através de um vetor de seleção, como um fagemídeo, um híbrido de fago filamentosso M13 e plasmídeo. O vetor pHEN4, (figura 2.5) derivado do fagemídeo pHEN1 (HOOGENBOOM; et al., 1991) foi utilizado para clonagem das bibliotecas dos antígenos TS e J-18.

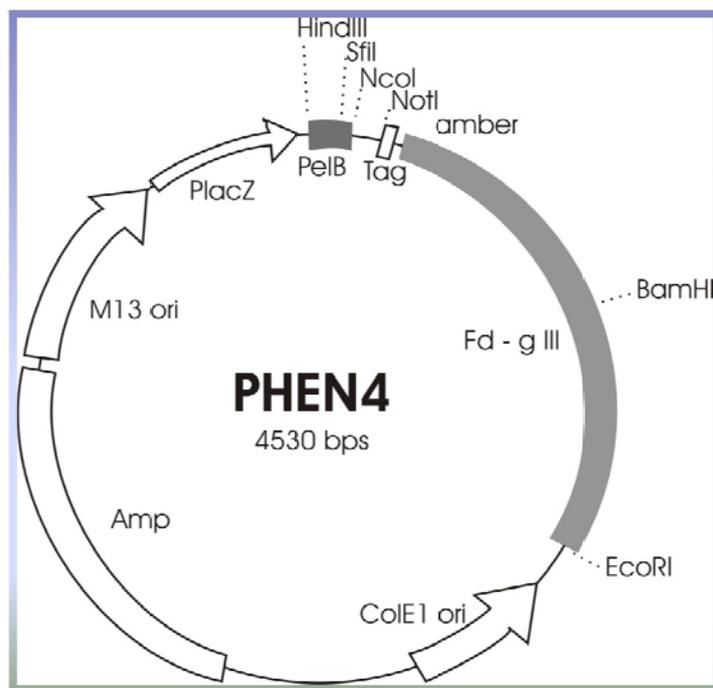


Figura 2.5: Mapa genético do vetor pHEN4

O pHEN4 contém uma origem de replicação de fago, M13 ori, a qual permite que o genoma seja empacotado juntamente com partículas do fago; uma origem de replicação em *E. coli*, colE1ori, que confere ao fagemídeo capacidade de replicação nas células hospedeiras *E. coli*; um gene que confere resistência a ampicilina, para seleção de colônias que contenham este fagemídeo; um peptídeo de secreção, pel B, para secreção da proteína III do fago fundida ao VHH ao espaço periplasmático da bactéria; uma sequência tag, gene que dá origem ao decapeptídeo YPYDVPDYGS, necessário para detecção por Elisa através de anti-tag; fd-g III, sequência de gene III que codifica a proteína III do fago, responsável pela infecção do fago e pela liberação de proteínas do fago; um fragmento do vetor pLacZ, com uma origem pUC de replicação, e que contém o promotor lacZ responsável pela regulação da expressão, promovida por IPTG e inibida por glicose, e um códon amber entre a sequência tag e a fd-g III que confere a oportunidade de produção da proteína fundida a proteína do fago, quando é utilizada cepa de *E. coli* não supressora como por exemplo a TG1, ou produzir anticorpos solúveis utilizando cepas de *E. coli* supressoras (VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSELS, 1996).

A porcentagem das colônias produtoras de VHH dentre todas as colônias obtidas da preparação da biblioteca de VHH pode ser visualizada na figura 2.6. Observa-se nesta figura a eletroforese após a amplificação por PCR de 31 colônias, a banda de aproximadamente 700 pares de base (indicada em negrito) refere-se ao VHH, sendo assim, aquelas colônias onde não se encontra esta banda não produzem VHH. Desta forma, podemos calcular a qualidade da biblioteca através da porcentagem de colônias produtoras de VHH, que deve ser no mínimo de 70%. Como mostrado na fotografia da figura 2.6, verifica-se a presença desta banda em 29 das 31 colônias analisadas, o que nos dá uma porcentagem de 93,55%, caracterizando uma excelente biblioteca.

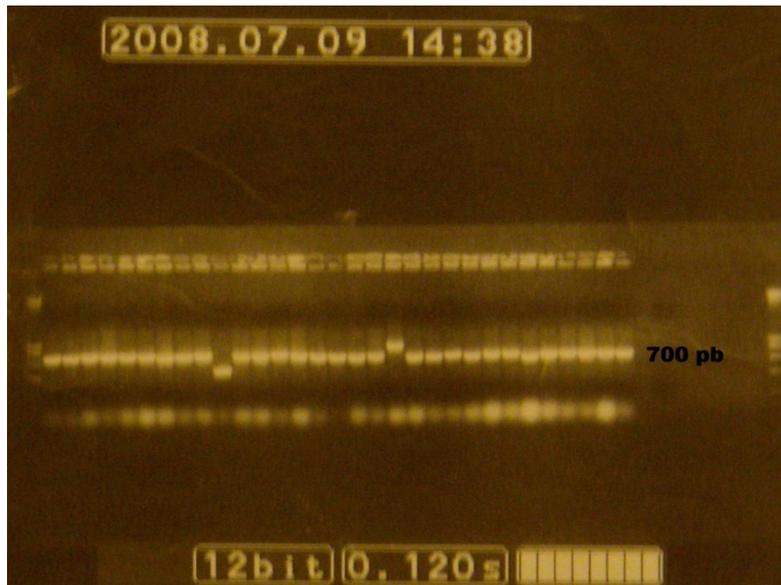


Figura 2.6: Eletroforese em gel de agarose das colônias da biblioteca de VHH

A partir da obtenção da biblioteca, realizou-se a seleção das colônias (panning) em três etapas. Para realização do panning foi necessário utilizar o helper fago M13KO7, pois o fagemídeo é incapaz de produzir partículas de fago sozinho, este fago auxiliar fornece os genes que são fundamentais para replicação do fago. O bacteriófago M13 é somente capaz de infectar bactérias que contenham F-pilus, pois a infecção é mediada pela interação entre a proteína III do fago e o F-pilus da bactéria hospedeira. Fagos filamentosos têm a característica de não lisarem a célula infectada, sendo capazes de se replicar e serem secretados sem matarem a bactéria hospedeira, enquanto a célula hospedeira continua a crescer e a se dividir (figura 2.7). As colônias que continham o fagemídeo foram intensamente infectadas pelo helper fago e que através da seleção (panning) foi possível o enriquecimento produzindo cepas altamente produtoras de VHH. A cada etapa de panning, os fagos que não expressavam VHH contra TS e J-18 foram eliminados pela lavagem com PBS e tween, restando somente aqueles que apresentaram forte afinidade pelo antígeno aderido ao poço da placa de Elisa. Estes fagos foram removidos, com auxílio de trietilamina, para serem novamente utilizados, para reinfecção de bactérias TG1 em crescimento em novo meio, para uma próxima etapa de

seleção. Desta forma, este meio de cultivo tornou-se enriquecido com as bactérias produtoras dos anticorpos de interesse.

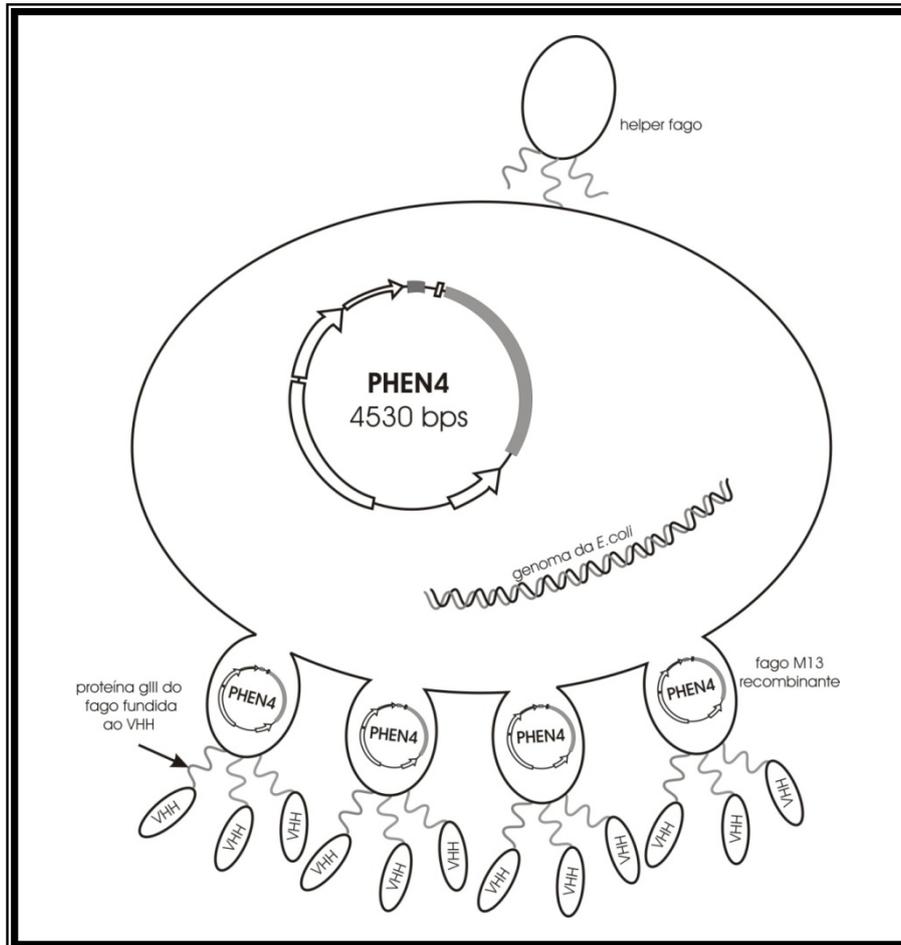


Figura 2.7: Interação entre o helper fago e o bacteriófago M13

Foram selecionadas de maneira aleatória, 48 colônias das 2^a e 3^a etapas de cada antígeno para escolha das colônias melhores produtoras de anticorpos. Para o antígeno TS, 28 colônias da segunda etapa e 41 da terceira, totalizando 69 das 96 colônias analisadas, apresentaram elevada absorvância no UV (405 nm) em relação aos respectivos brancos, indicando uma boa produção de anticorpos destas colônias; para o antígeno J-18, boa absorção foi registrada em 6 colônias da segunda etapa de seleção e 4 colônias da terceira etapa, totalizando 10 colônias entre 96 analisadas. O enriquecimento das etapas de seleção em relação a biblioteca, verificado por Elisa, pode ser visualizado nas tabelas 2.2 e 2.3.

Tabela 2.2. Resultados de Elisa para o antígeno J-18

	Biblioteca	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa	branco
Ag +	0,302	0,155	0,910	0,860	0,052
Ag -	0,155	0,102	0,351	0,120	0,059
(Ag+ - Ag-)	0,147	0,053	0,559	0,740	0,007

Ag + = coberto com antígeno; Ag - = sem antígeno

Tabela 2.3. Resultados de Elisa para o antígeno TS

	Biblioteca	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa	branco
Ag +	0,642	1,164	1,081	1,121	0,060
Ag -	0,095	0,313	0,200	0,178	0,055
(Ag+ - Ag-)	0,547	0,851	0,881	0,943	0,005

Ag + = coberto com antígeno; Ag - = sem antígeno

Observa-se na tabela 2.2 que houve um grande aumento na densidade ótica observada nas 2ª e 3ª etapas para o J-18 em comparação com a 1ª etapa, mostrando o enriquecimento obtido. Já observando a tabela 2.3, vemos o enriquecimento da 1ª etapa em relação a biblioteca, e a cada etapa de seleção visualizamos uma menor quantidade de nanoanticorpos inespecíficos que se aderiram a placa de Elisa, e que a densidade ótica da TS foi em geral maior que a do J-18, indicando uma maior produção de nanoanticorpos a partir do antígeno TS.

Para fazer uma subseleção de um grande número de clones positivos, foi realizada uma análise de Hinf (uma digestão do DNA que geram diferentes tamanhos de fragmentos, de modo geral, fragmentos iguais significam sequencias iguais), e de acordo com as diferenças nos padrões de digestão visualizados no gel de agarose, os clones foram preparados e enviados para sequenciamento. Assim, duas colônias do antígeno J-18 foram descartadas por apresentarem semelhante padrão de digestão, o que indica que produzem anticorpos muito semelhantes ou mesmo iguais, atuando sobre o mesmo epítipo, da mesma forma, 18 clones para o antígeno TS foram selecionados. Assim, 26 clones no total foram enviados para sequenciamento de nucleotídeos.

As sequencias de aminoácidos que compõem os VHHs obtidos estão mostrados no Apêndice C (pg.121).

A obtenção de anticorpos solúveis a partir do vetor pHEN4 e bactérias supressoras, seria um método dispendioso, visto que necessitaria da realização de uma cromatografia de afinidade, utilizando uma matriz de afinidade que contenha anticorpo anti-HA tag. O recurso mais barato utilizado foi a troca de vetor, através da inserção do fragmento de DNA que continha o nanoanticorpo ao vetor pBad/gIII. Este novo vetor contém a sequencia (His)₆, ou seja, seis histidinas ligadas, que permite uma purificação rápida por cromatografia utilizando níquel quelado, permitindo a imobilização de proteínas que contenham a cauda de (His)₆.

O vetor pBAD/gIII (figura 2.8) possui uma sequencia denominada *araBAD* promoter, que promove a expressão de genes de plasmídeos controlada pela concentração de arabinose no meio de cultura; uma sequencia de ligação ribossômica otimizada, que aumenta a eficiência da expressão da proteína fundida recombinante; uma sequencia de iniciação denominada ATG que providencia uma sequencia de iniciação da tradução para a proteína fundida; um sinal de secreção de gene III, que permite a secreção da proteína recombinante no espaço periplasmático; uma sequencia de clonagem múltipla (MCS), para inserção do gene escolhido utilizando enzimas de restrição; uma sequencia de epitopo C-terminal *myc* tag, que permite a detecção da proteína fundida pelo anticorpo anti-*Myc*; uma região C-terminal de polihistidina, que forma um sítio de ligação com metal, útil para purificação em cromatografia de afinidade em resina quelada com níquel, permitindo também, a detecção de proteína recombinante com anticorpo anti-His; uma sequencia *rrnB* de terminação de transcrição (término); um gene de resistência a ampicilina, que permite a seleção do plasmídeo na *E. coli*; uma sequencia pBR322 origin, que permite poucas cópias de replicação por célula de *E. coli*, e *araC* gene; que regula positivamente a atividade do *araBAD* promoter na presença de arabinose (EVANS, et al., 1985; SCHLEIF, 1992; RAPOZA; WEBSTER, 1993; GUZMAN, et al., 1995).

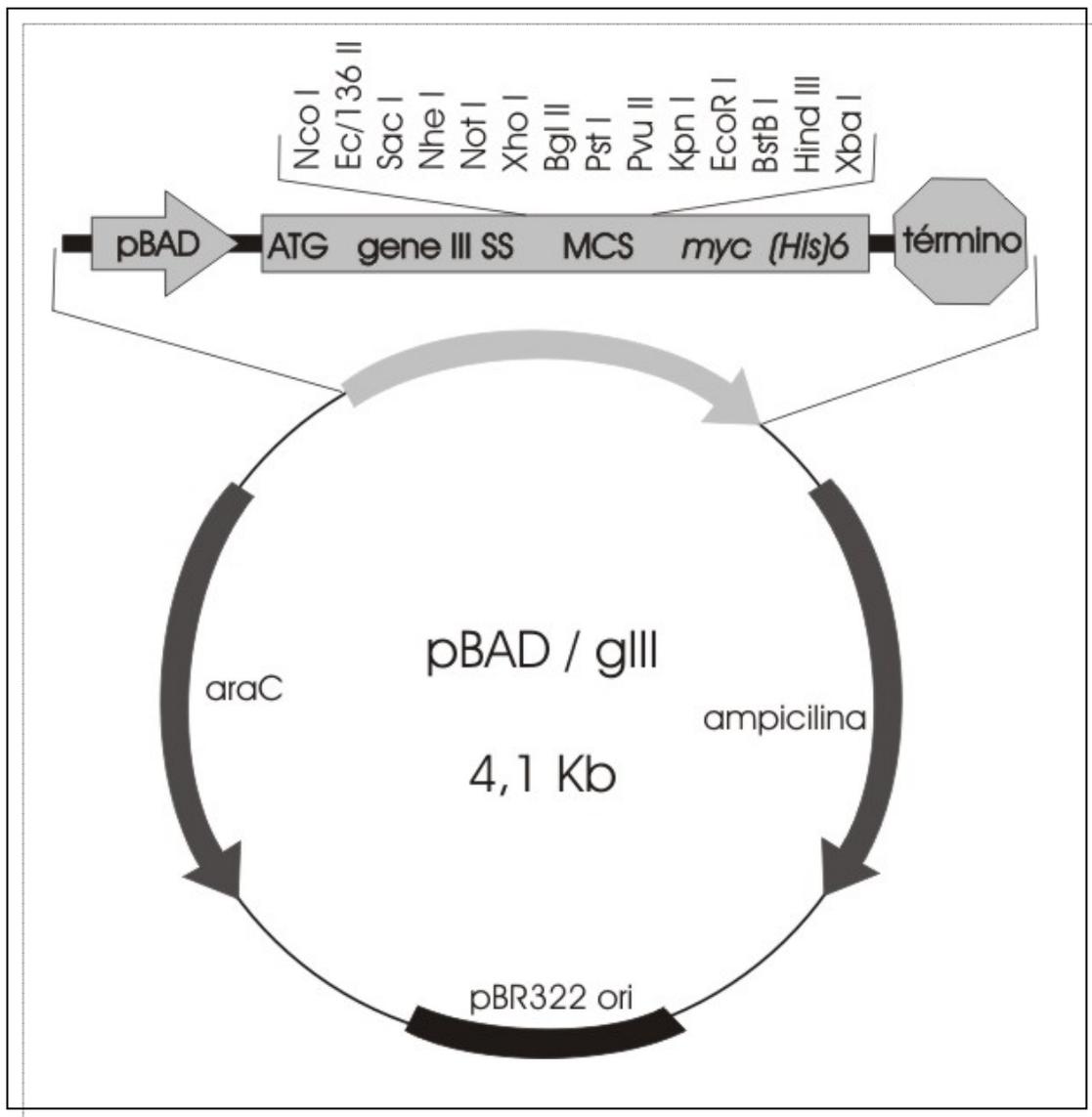


Figura 2.8: Mapa genético do vetor pBAD/gIII

Para realizar a troca de vetor foi necessário, obter novos primers para acrescentar as sequencias de clivagem das enzimas de restrição presentes no novo vetor e para produzir através de PCR a sequencia dos VHHs para inserção neste novo vetor. Os primers selecionados foram Fwd pBAD NcoI, que se anela na fita antisense (3' - 5' do gene VHH) e o Rev pBAD Sall que se anela a fita sense (5' - 3' do gene VHH). No primer Fwd pBAD NcoI, o nucleotídeo CAG que codifica o aminoácido glutamina (Q), o primeiro aminoácido do VHH, foi trocado por GAA que codifica o aminoácido ácido glutâmico (E), para que não fosse preciso inserir mais um códon no primer, para que a enzima NcoI pudesse ter seu sítio de ação (figura 2.9).

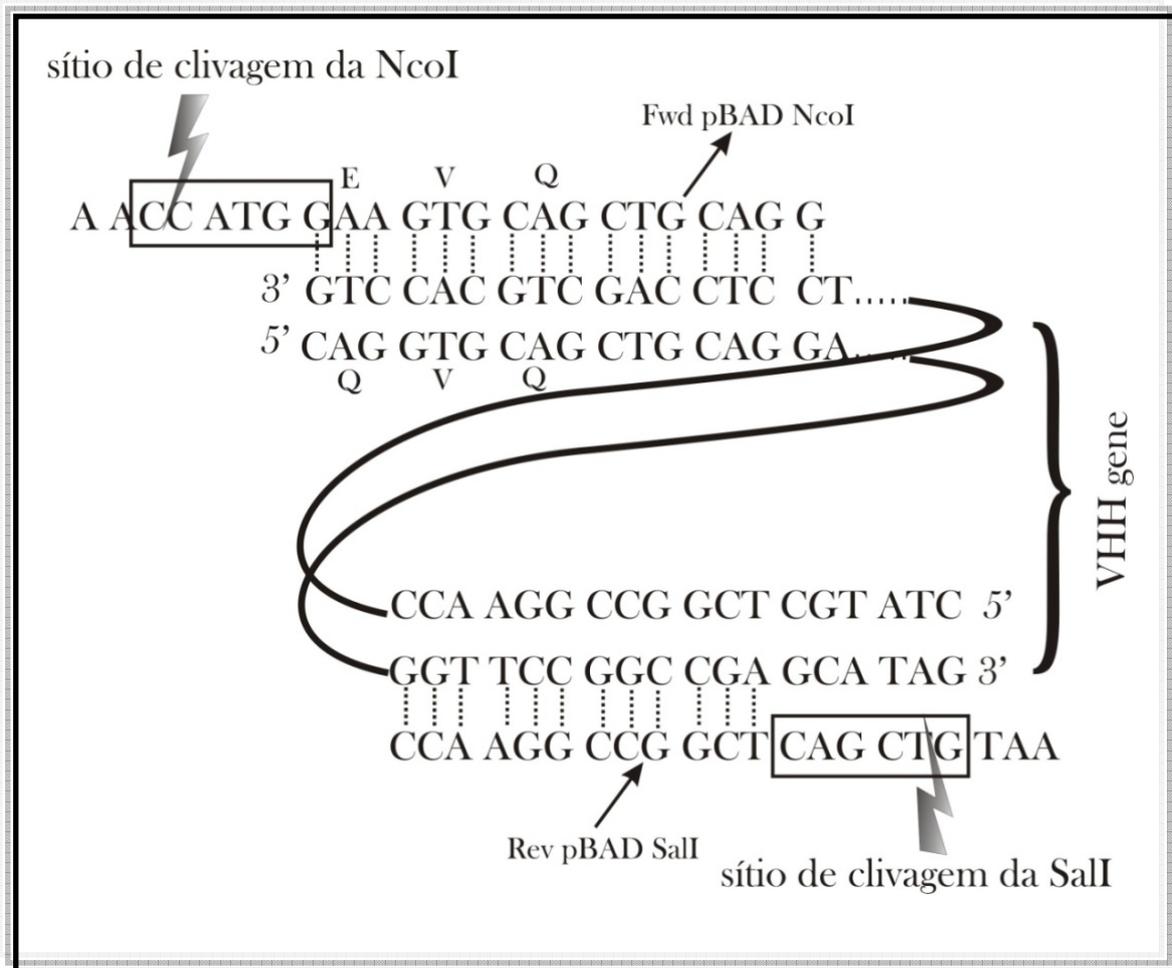


Figura 2.9: Primers do VHH para troca de vetor

Após a troca de vetor o gene de um clone foi expresso em quadruplicata com a indução de L-arabinose e sem a indução. A figura 2.10 mostra a intensidade da banda entre 10 e 20 kDa dos clones induzidos e não induzidos, sugerindo a expressão do nanoanticorpo desejado.

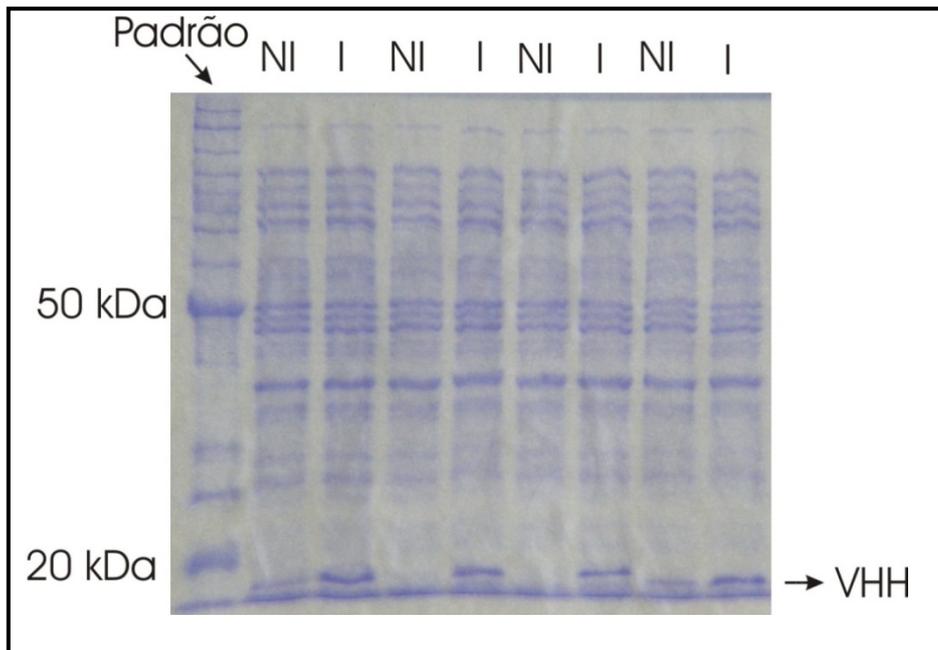


Figura 2.10: Eletroforese dos clones não induzidos (NI) e induzidos (I) por L-arabinose

Através da tecnologia de “Phage display” foi possível obter nanoanticorpos contra os antígenos de transialidase e J-18. No entanto a obtenção de um Sistema Fármaco- Anticorpo Dirigido não será possível de se realizar com os nanoanticorpos anti-transialidase, visto que o antígeno escolhido, a transialidase, está aderido à âncora GPI (Glicosilfosfatidilinositol) na forma tripomastigota de *T. cruzi* e possui a capacidade de se clivar desta âncora liberando-se para circulação sanguínea, fazendo com que o anticorpo não direcione a substância ativa ao alvo celular, mas sim a uma proteína livre na circulação sanguínea. Com esta característica o antígeno transialidase torna-se inadequado para a realização de um Sistema fármaco-anticorpo dirigido.

2.5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir de linfócitos de sangue de dromedário e através da tecnologia de “Phage Display” foi possível selecionar os nanoanticorpos contra TS e J-18 de maneira eficiente e também foi possível a troca de vetor para um vetor de expressão, para que fosse expresso com sucesso um desses nanoanticorpos.

Os nanoanticorpos contra J-18 poderão ser testados para inibição da transmissão por via oral em camundongos, visto que a proteína gp82 é uma molécula de adesão do *T. cruzi* que induz aumento na concentração de Ca^{+2} que é um evento fundamental no processo de invasão pelo *T cruzi*.

Com os nanoanticorpos contra transialidase, será possível selecionar os nanoanticorpos que atuam contra o sítio catalítico desta enzima, e ainda realizar a produção de anticorpos biespecíficos para recrutar efetivamente células efectoras citotóxicas do sistema imunológico contra células-alvo patogênicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Em acordo com normas estabelecidas pela ABNT (NBR6023 e NBR10520)

AMES, B.; LEE, F.; DURSTON, W. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 70, p. 782-786, 1973.

AXYS PHARMACEUTICALS INC. Palmer, J. T.; Rasnick, D.; Klaus, J. L. **Irreversible cysteine protease inhibitors containing vinyl groups conjugated to electron withdrawing groups**. US 6,287,840 B1, Aug. 18th, 1999, Sep. 11th, 2001.

BOCEDI, A.; GRADONI, L.; MENEGATTI, E.; ASCENZI, P. Kinetics of parasite cysteine proteinase inactivation by NO-donors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 315, p. 710-718, 2004.

BONNET, B.; SOULLEZ, D.; GIRAULT, S.; MAES, L.; DAVIDOUD-CHARVET, E.; SERGHERAERT, C. Trypanothione reductase inhibition/trypanomicidal activity relationships in a 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine series. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 8, p. 95-103, 2000.

BOULIANNE, G. L.; HOZUMI, N.; SCHULMAN, M. J. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. **Nature**, v. 312, p. 643-646, 1984.

BUCHINI, S.; BUSCHIAZZO, A.; WITHERS, S. G. A new generation of specific *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibitors. **Anger. Chem. Int. Ed.**, v. 47, p. 2700-2703, 2008.

BUSCHIAZZO, A.; AMAYA, M.; CREMONA, M.; FRASCH, A.; ALZARI, P. The crystal structure and mode of action of trans-sialidase, a key enzyme in *Trypanosoma cruzi* pathogenesis. **Mol. Cell**, v. 10, p. 757-768, 2002.

CARMEN, S.; JERMUTUS, L. Concepts in antibody phage display. **Brief. Funct. Genomic. Proteomic.**, v. 1, p.189-203, 2002.

CHAMOND, N.; COATNOAN, N.; MINOPRIO, P. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. **Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.**, v. 2, p. 247-254, 2002.

CHARI, R. V. J. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc. Chem. Res.**, v. 41 p. 98-107, 2008.

CHIYANZU, I.; HANSELL, E.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Evaluation of Isatins and Thiosemicarbazone Derivatives against Cruzain, Falcipain-2 and Rhodesain. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v.13, p. 3527–3530, 2003.

CHUNG, M. C.; FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quím. Nova**, v. 22, p.75-84, 1999.

CIMERMAN, S.; CIMERMAN, B. **Medicina Tropical**. São Paulo: Atheneu, 2003.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed . A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102 (suppl. I) , p. 113-122, 2007.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A. Critical review on chagas disease chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 3-24, 2002.

CLICK, L. R.; KOLIVRAS, K. N.; RESLER, L. M.; BREWSTER, C. C.; PAULSON, S. L; The potential for emergence of Chagas Disease in the United States. **Geospat. Health**, v. 2, p. 227-239, 2008.

DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid. Biol. Dis.**, v. 1, n. 3, 2002. Disponível em: <<http://www.kinetoplastids.com/content/1/1/3>>.

DEANE, M. P.; LENZI, H. L.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 79 (suppl.), p. 513-515, 1984.

DEBNATH, A. K.; DEBNATH, G.; SHUSTERMAN, A. J.; HANSCH, C. A QSAR investigation of the role of hydrophobicity in regulating mutagenicity in the Ames test: 1. Mutagenicity of aromatic and heteroaromatic amines in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 19, p. 37–52, 1992a.

DEBNATH, A. K.; HANSCH, C. Structure-activity relationship of genotoxic polycyclic aromatic nitro compounds: further evidence for the importance of hydrophobicity and molecular orbital energies in genetic toxicity. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 20, p. 140–144, 1992.

DEBNATH, A. K.; LOPEZ DE COMPADRE, R. L.; DEBNATH, G.; SHUSTERMAN, A. J.; HANSCH, C. Structure-activity relationship of mutagenic aromatic and heteroaromatic nitro compounds. Correlation with molecular orbital energies and hydrophobicity. **J. Med. Chem.**, v. 34, p. 786–797, 1991.

DEBNATH, A. K.; LOPEZ DE COMPADRE, R. L.; SHUSTERMAN, A. J.; HANSCH, C. A QSAR investigation of the role of hydrophobicity in regulating mutagenicity in the Ames test: 1. Mutagenicity of aromatic and heteroaromatic nitro compounds in *Salmonella typhimurium* TA100. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 19, p. 53–70, 1992b.

DOS REIS, G. A.; LOPES, M. F. Apoptose e doença de Chagas – um papel na imuno-regulação? Disponível em <[HTTP://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=164](http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=164)>. Acesso em 19/11/2008), 2008.

DOS REIS, G. A.; PEÇANHA, L. M. T.; BELLIO, M.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Glycoinositol phospholipides from *Trypanosoma cruzi* transmit signal to the cells of host immune system. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1007-1013, 2002.

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 thiosemicarbazone inhibitors of trypanosomal cysteine protease cruzipain. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DUTTA, A., BANDYOPADHYAY, S., MANDAL, C., CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolated of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitol. Internat.**, v. 54, p. 119-122, 2005.

ELIAS, D. J.; HIRSCHOWITZ, L.; KLINE, L. E.; KROENER, J. F.; DILLMAN, R. O.; WALKER, L. E.; ROBB, J. A.; TIMMS, R. M. Phase I clinical comparative study of monoclonal antibody KS1/4 and KS1/4 –methotrexate immunconjugate in patients with non-small cell lung carcinoma. **Cancer Res.**, v. 50, p. 4154–4159, 1990.

ENGEL, J. C.; DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 188, p. 725-734, 1998.

EVANS, G. I.; LEWIS, G. K.; RAMSAY, G.; BISHOP, V. M. Isolation of monoclonal antibodies specific for *c-myc* proto-oncogene product. **Mol. Cell. Biol.**, v. 5, p. 3610-3616, 1985.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Eliminação da transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans* no Brasil: Um fato histórico. **Rev. Soc. Bra. Med. Trop.**, v. 39, p. 507-509, 2006.

FUJII, N.; MALLARI, J. P.; HANSELL, E. J.; MACKEY, Z.; DOYLE, P.; ZHOU, Y. M.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; GUY, R. K. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 121–123, 2005.

GATEHOUSE, D.; HAWORTH, S.; CEBULA, T.; GOCKE, E.; KIER, L.; MATSUSHIMA, T.; MELCION, C.; NOHMI, T.; OHTA, T.; VENITT, S.; ZIEGER, E. Recommendations for the performance of bacterial mutation assays. **Mutat. Res.**, v. 312, p. 217–233, 1994.

GOLDBAUM, M.; BARRETO, M. L. Commentary: The contribution and example of Carlos Chagas. **Internati. J. Epidemiol.**, v. 37, p. 697-698. 2008.

GREENBAUM, D. C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and structure–activity relationships of parasitocidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 3212-3219, 2004.

GUZMAN, L. –M.; BARONDESS, J. J.; BECKWITH, J. FtsL, an essential cytoplasmic membrane protein involved in cell division in *Escherechia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 7716-7728, 1992.

HAMERS-CASTERMAN, C.; ATARHOUCHE, T.; MUYLDERMANS, S.; HAMERS, C.; ROBINSON, G.; SONGA, E. B.; BENDAHMAN, N.; HAMERS, R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. **Nature**, v. 363, p. 446-448, 1993.

HARTMAN, F.; RENNER, C.; JUNG, W.; DA COSTA, L.; TEMBRINK, S.; HELD, G.; SEK, A.; KÖNIG, J.; BAUER, S.; KLOFT, M.; PFREUNDSCHUH, M. Anti-CD16/CD30 bispecific antibody treatment for Hodgkin's disease: role of

infusion schedule and costimulation with cytokines. **Clin. Cancer. Res.**, v. 7, p. 1873-1888, 2001.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. JR. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat. Res.**, v. 245, p. 245-249. 1990.

HOELZER, W.; MUYLDERMANS, S.; WERNERY, U. A note on camel IgG antibodies. **J. Camel Pract. Res.**, v. 5, p. 187-1882, 1998.

HOOGENBOOM, H. R.; GRIFFITHS, A. D.; JOHNSON, K. S.; CHISWELL, D. J.; HUDSON, P.; WINTER, G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 4133-4137, 1991.

HUANG, L.; LEE, A.; ELLMAN, J. A. Identification of potent and selective mechanism-based inhibitors of the cysteine protease cruzain using solid-phase parallel synthesis. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 676-684, 2002.

JÄGER, A. V.; MUIÁ, R. P.; CAMPETELLA, O. Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 283, p. 182-188, 2008.

KELLERMANN, S-A.; GREEN, L. L. Antibody discovery: the use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 13, p. 593-597, 2002.

KLOPMAN, G.; TONUCCI, D. A.; HOLLOWAY, M.; ROSENKRANZ, H. S. Relationship between polarographic reduction potential and mutagenicity of nitroarenes. **Mutat. Res.**, v. 126, p. 139-144, 1984.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

KUUS-REICHEL, K.; GRAUER, L. S.; KARAVODIN, L. M.; KNOTT, C.; KRUSEMEIER, M.; KAY, N. E. Will immunogenicity limit the use, efficacy and future development of therapeutic monoclonal antibodies? **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. , p. 365-372, 1994.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi*. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia Humana**. 8. ed. São Paulo: Atheneu, 1991. p. 73-104.

LEONARD, N. J.; BOYD, S. N. Cinnolines. I. Synthesis of aminoacetophenones and aminopropiophenones. **J. Org. Chem.**, v.11, p. 405-418, 1946

LEVY, M. Z; BOWMAN, N. M; KAWAI, V; WALLER, L. A; DEL CAPIO, J. G. C; BEMZAQUEN, E. C; GILMAN, R. H; BERN, C. Periurban *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. **Emerging Infect. Dis.**, v. 12, p. 1345-1352, 2006.

LLORENS, O.; PEREZ, J. J.; VILLAR, H. O. Toward the Design of Chemical Libraries for Mass Screening Biased against Mutagenic Compounds. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 2793-2804, 2001.

LLORENZ, O.; PEREZ, J. J.; VILLAR, H. O. Investigation of structural and electronic biases in mutagenic compounds. **Int. J. Quantum Chem.**, v. 88, p. 107–117, 2002.

LOPEZ DE COMPADRE, R. L.; DEBNATH, A. K.; SHUSTERMAN, A. J.; HANSCH, C. LUMO energies and hydrophobicity as determinants of mutagenicity by nitroaromatic compounds in *Salmonella typhimurium*. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 15, p. 44–55, 1990.

LOPEZ DE COMPADRE, R. L.; SHUSTERMAN, A. J.; HANSCH, C. The role of hydrophobicity in the Ames test. The correlation of the mutagenicity of nitropolycyclic hydrocarbons with partition coefficients and molecular orbital indices. **Int. J. Quantum Chem.**, v. 34, p. 91–101, 1988.

MEISTER, A; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711–760, 1983.

MISAKI, K.; YOSHIHARU, H.; SUZUKI, H.; TAKAMURA-ENYA, T. Evaluation of the mutagenicity of nitration products derived from phenalenone (1H-phenalen-1-one). **Mutagenesis**, v. 23, p. 359–366, 2008.

MORRISON, R; BOYD, R. **Química Orgânica**. 13. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1996.

MUCCI, J.; RISSO, N. G.; LEGUIZAMÓN, M. S.; FRASCH, A. C. C.; CAMPETELLA, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* triggers apoptosis by targets cell sialylation. **Cell. Microbiol.**, v. 8, p. 1086-1095, 2006.

MUYLDERMANS, S. Single domains camel antibodies: current status. **Rev. Mol. Biotechnol.**, v. 74, p. 277-302, 2001.

NERES, J.; BRYCE, R. A.; DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas Disease. **Drug Discov. Today**. v. 13, p. 110-117, 2008.

NGUYEN, V. K.; DESMYTER, A.; MUYLDERMANS, S. Functional Heavy-chain antibodies in Camelidae. **Adv. Immunol.**, v. 79, p. 261-295, 2001.

NÓBREGA, A. A.; GARCIA, M. H.; TATTO, E.; OBARA, M. T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W. N. oral transmission of Chagas Disease by consumption of açaí palm fruit, Brazil. **Emerging Infect. Dis.**, v. 15, p. 653-655, 2009.

NORRIS, K. A.; SCHRIMPF, J. E. Biochemical analysis of the membrane and soluble forms of the complement regulatory protein of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 236-243, 1994

OLSON, W. C.; HESTON, W. D. W.; RAJASEKARAN, A. K. Clinical trials of cancer therapies targeting prostate-specific membrane antigen. **Rev. Recent. Clin. Trials**, v. 2, p. 182-190, 2007.

OUAISSI, A. Regulatory cells and immunosuppressive cytokines: parasite-derived factors induce immune polarization. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 2007, p. 1-10, 2007.

OUAISSI, A.; OUAISSI, M.; Molecular basis of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* interaction with their host(s): exploitation of immune and defense mechanisms by the parasite leading to persistence and chronicity, features reminiscent of immune system evasion strategies in cancer diseases. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v. 53, p. 102-114, 2005.

PALMER, J. T.; RASNICK, D.; KLAUS, J. L.; BROMME, D. J. Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 3193-3196, 1995.

PARIS, G.; CREMONA, M. L.; AMAYA, M. F.; BUSCHIAZZO, A.; GIAMBIAGI, S.; FRASCH, C. C.; ALZARI, P. M. Probing molecular function of trypanosomal sialidases: single point mutations can change substrate specificity and increase hydrolytic activity. **Glycobiology**, v. 11, p. 305-311, 2001.

PORCAL, W.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; BOIANI, M.; FERREIRA, A.; CHIDICHIMO, A.; CAZZULO, J. J.; OLEA-AZAR, C.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 6995-7004, 2008.

RAPOZA, M. P.; WEBSTER, R. E. The filamentous bacteriophage assembly proteins require the bacterial SecA protein for correct localization to the membrane. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 1856-1859, 1993.

REICHERT, J. M.; VALGE-ARCHER, V. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 349-356, 2007.

RIECHMANN, L.; CLARK, M.; WALDMANN, H.; WINTER, G. Reshaping human antibodies for therapy. **Nature**, v. 332, p. 323-327, 1988

RODRIGUEZ, E. V. A.; ZUNIGA, E. I.; MONTES, C. L.; MERINO, M. C.; BERMEJO, D. A.; AMEZCUA VESCLY, M. C.; MOTRAN, C. C.; GRUPPI, A. *Trypanosoma cruzi* infection beats B-cell compartment favoring parasite establishment: can we strike first? **Scand. J.Immunol.**, v. 66, p. 137-142, 2007.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Chagas Disease: An emerging food-born entity? **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 2, p. 149-150, 2008.

ROSENKRANZ, H. S.; MERMELSTEIN, R. O. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. **Mutat. Res.**, v. 114, p. 217–267, 1983.

ROSS, H. J.; HART, L. L.; SWANSON, P. M.; RARICK, M. U.; FIGLIN, R. A.; JACOBS, A. D.; MCCUNE, D. E.; ROSENBERG, A. H.; BARONI, A. D.; GROVE, L. E.; THORN, M. D.; MILLER, D. M.; CRACHMAN, J. G.; RUDIN, C. M. A randomized, multicenter study to determine the safety and efficacy of the immunoconjugate SGN-15 plus docetaxel for the treatment of non-small cell lung carcinoma. **Lung Cancer**, v. 54, p. 69-77, 2006.

SCHMUNIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas Disease: Status in the blood supply in endemic and non endemic countries. **Transfusion**, v. 31, p. 547-557, 1991.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas Disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75-85, 2007.

SCHMUNIS, G. A. Southern cone initiative. In: **Proceedings of the second international workshop on population genetics and control of *Triatominae***. Schofield, C. J.; Ponce, C. (ed.). Cidade do México:INDRE, 2004. p. 26-31.

SCHLEIF, R. S. DNA looping. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 199-223, 1992.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A.; SIQUEIRA, G. S.; BARONE, A. A.; DIAS, J. C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J. E.; PERES, B. A.; ARRUDA JÚNIOR, E. R. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p. 351-357, 1991.

SILES, R.; CHEN, S-E.; ZHOU, M.; PINNEY, K. G.; TRAWICK, M. L. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. **Bioor. Med. Chem. Lett.**, v. 16, P. 4405-4409, 2006.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T.; CERON, C. R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arq. Ciênc. Saúde**, v. 11, p.44-47, 2004.

TEIXEIRA, A. R. L.; NITZ, N.; GUIMARO, M. C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C. A. Chagas Disease. **Postgrad. Med. J.**, v. 82, p. 788-798, 2006.

TODESCHINI, A. R.; NUNES, M. P.; PIRES, R. S.; LOPES, M. F.; PREVIATO J. O.; MENDONCA-PREVIATO, L.; DOSREIS, G. A. Costimulation of host T lymphocytes by a trypanosomal *trans*-silaidase: involvement of CD43 signaling. **J. Immunol.**, v. 168, p. 5192-5198, 2002.

TOKIWA, H.; OHNISHI, Y. Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. **CRC Crit. Rev. Toxicol.**, v. 17, p. 23-60, 1986.

TONLINSON, S.; RAPER, J. Natural human immunity to trypanosomes. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 354-359, 1998.

TRIBULATTI, M. V.; MUCCI, J.; ROOIJEN, N. V.; LEGUIZAMÓN, M. S.; CAMPETELLA, O. The trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces thrombocytopenia during acute Chagas' Disease by reducing the platelet sialic acid contents. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 201-207, 2005.

URBINA, J. A. Chemotherapy of chagas' disease: the how and why. **J. Mol. Med.**, v. 77, p. 332-338, 1999.

URBINA, J. A.; DO CAMPO, R.; specific chemotherapy of Chagas Disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 495-501, 2003.

VERCELLI, C. A.; HIDALGO, A. M.; HYON, S. H.; ARGIBAY, P. F. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase inhibits human lymphocyte proliferation by nonapoptotic mechanisms: implications in pathogenesis and transplant immunology. **Transplant. Proc.**, v. 37, p. 4594-4597, 2005.

VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSELS. Hamers, R.; Muyldermans, S. **Variable fragments of immunoglobulins – use for therapeutic or veterinary purposes**. EP 0739981 A1, Apr. 25th, 1995, Oct. 10th, 1996.

WATERS, W. A. The nitration of 3-acetamidoacetophenone. **J. Chem. Soc.**, p. 629, 1945

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Chagas Disease**, disponível em: <<http://www.who.int/ctd/chagas/disease.htm>>. Acesso em 10/04/2003, 2003.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Control of Chagas Disease. **Technical Report Series**, 811. Geneva: WHO, 1991.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Chagas disease: control and elimination**, disponível em: <http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/>. Acesso em: 20/06/2009, 2008.

GLOSSÁRIO

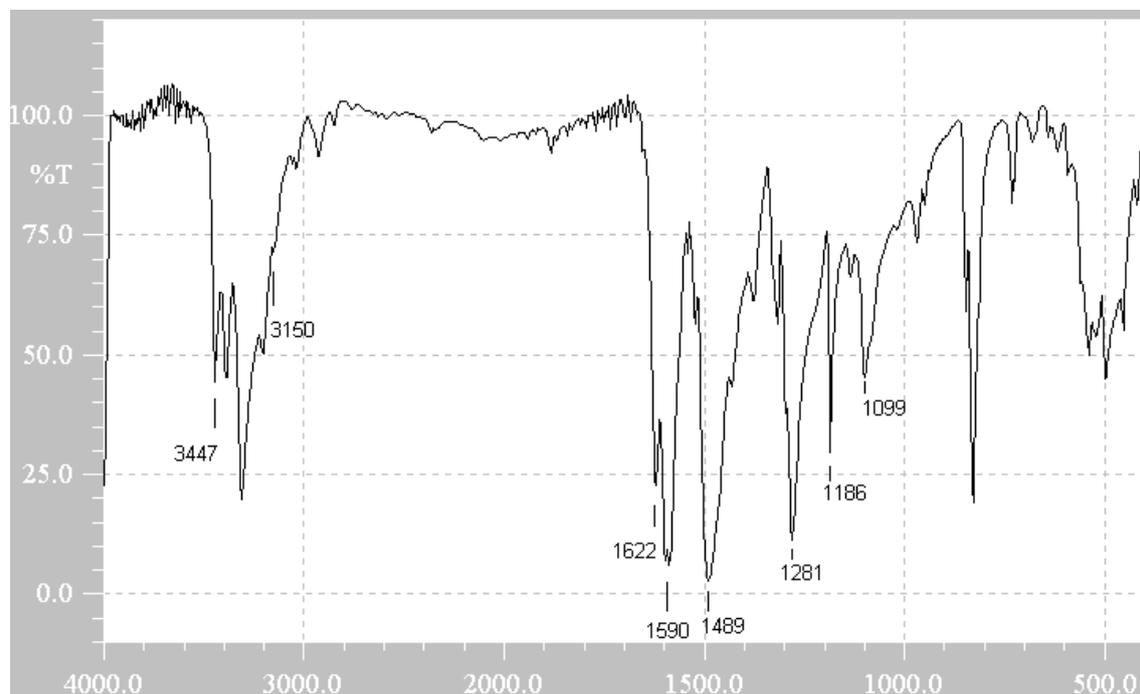
A6G	Primer (GAT.GTG.CAG.CTG.CAG.GAG.TCT.GGA/G.GGA.GG)
AMC	Anticorpo monoclonal
TCR	Receptor de célula T
Call001	Primer (GTC.CTG.GCT.CTT.CTA.CAA.GG)
Call002	Primer (GGT.ACG.TGC.TGT.TGA.ACT.GTT.CC)
Cap	região de interação da cruzipaína
CDR	Regiões de ligação com o antígeno
CH	Cadeia pesada
CMC	Carboximetilcelulose
CRP	Proteínas regulatórias do complemento
DEPC	Dietilcianofosfonato
dNTPs	Bases nucleotídicas
DTT	Ditiotreitol
Fab	Fragmento de ligação com o antígeno
F(ab')₂	Dois fragmentos Fab gerados a partir da digestão com papaína do anticorpo inteiro
Fas	Complexo sinalizante de morte induzida
FasL	Proteína transmembrana II pertencente à família de fator de necrose tumoral (TNF)
Fc	Região de fragmento cristalizável
FR4FOR	Primer (GGA.CTA.GTG.CGG.CCG.CTG.GAG.ACG.GTG.ACC.TGG.GT)
Gal-1	Proteína imunorregulatória galecetina-1
GIPL	Glicoinositolfosfolipídeos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GP82	Glicoproteína de superfície presente nas formas metacíclicas de <i>T. cruzi</i> , pertencentes à grande família das transialidases
HPRI	Inibidor de RNase placentária humana

IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
J-18	Proteína recombinante derivada de GP82 fundida a glutathione S-transferase
Lit	Infusão de fígado e triptose
Lumo	Orbital molecular desocupado de mais baixa energia
MTT	brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]
P1, P1', P2	Regiões de interação da cruzipaina
pBAD-GIII	Vetor de expressão
PBS	Solução tampão fosfato
PBST	PBS acrescido de tween
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pHEN4	Vetor de seleção
QSAR	Relações quantitativas de estrutura-atividade
SAPA	Shed acute phase antigen
SAR	Relações estrutura atividade
SDS	Dodecilsulfato de sódio (laurilsulfato de sódio)
SN2	Reação de substituição nucleofílica de segunda ordem
Taq polimerase	Polimerase de DNA termoestável
TBE	Solução tampão constituída de base Tris, ácido bórico, EDTA e água
Tc52	Proteína fundamental para o processo infeccioso do <i>T. cruzi</i> . Age na célula do sistema imunológico humano inibindo a síntese de interleucina-2
TG1	Cepa de <i>E. coli</i>
TS	Transialidase
VH	Fragmento variável de cadeia pesada de reconhecimento do antígeno
VHH	Nanoanticorpos de camélídeos
VL	Fragmento variável de cadeia pesada de reconhecimento do antígeno
β-Gal	Beta galctosidase

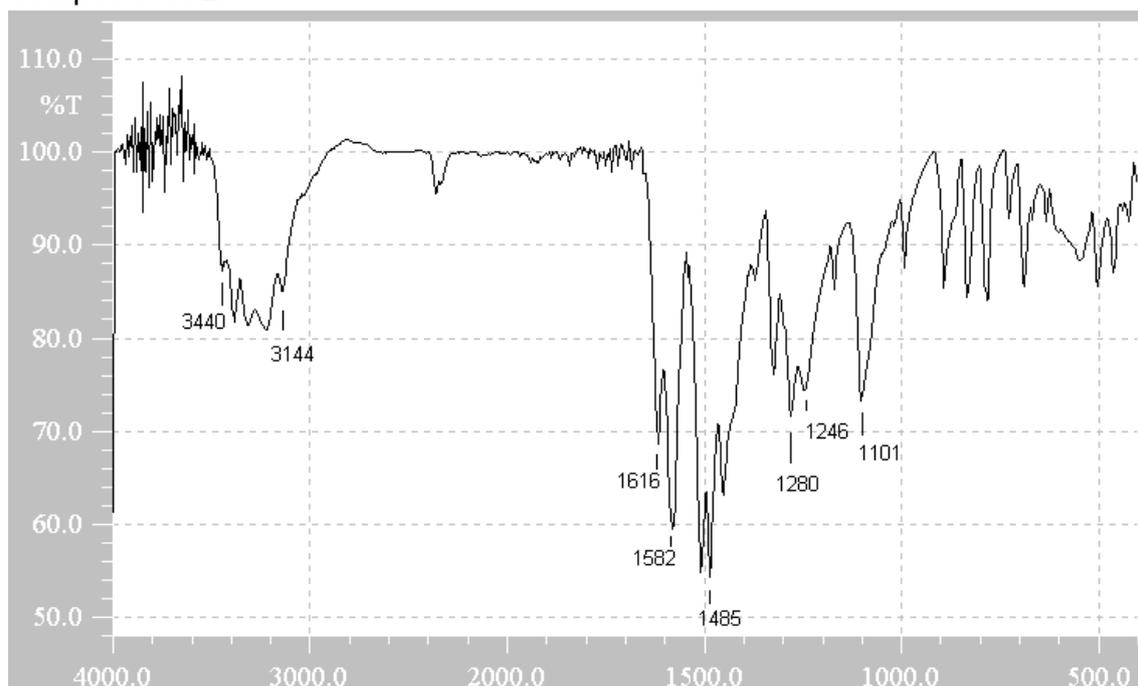
APÊNDICE A - Espectros de infravermelho

(pastilhas de KBr ($\nu = \text{cm}^{-1}$))

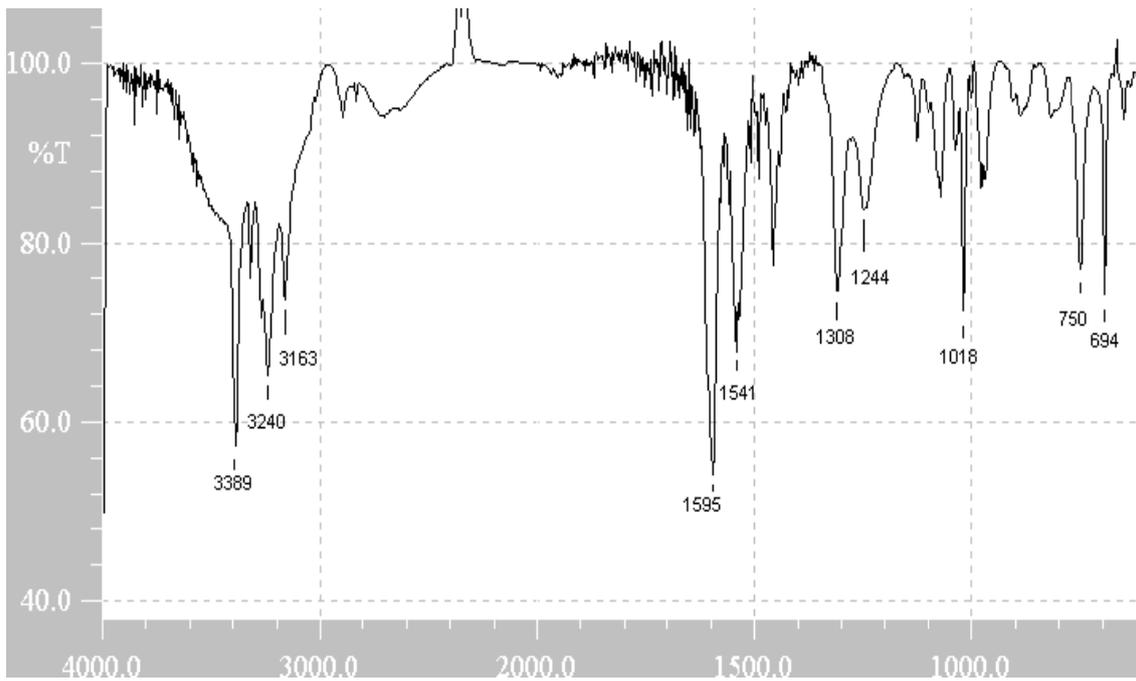
Composto TS1



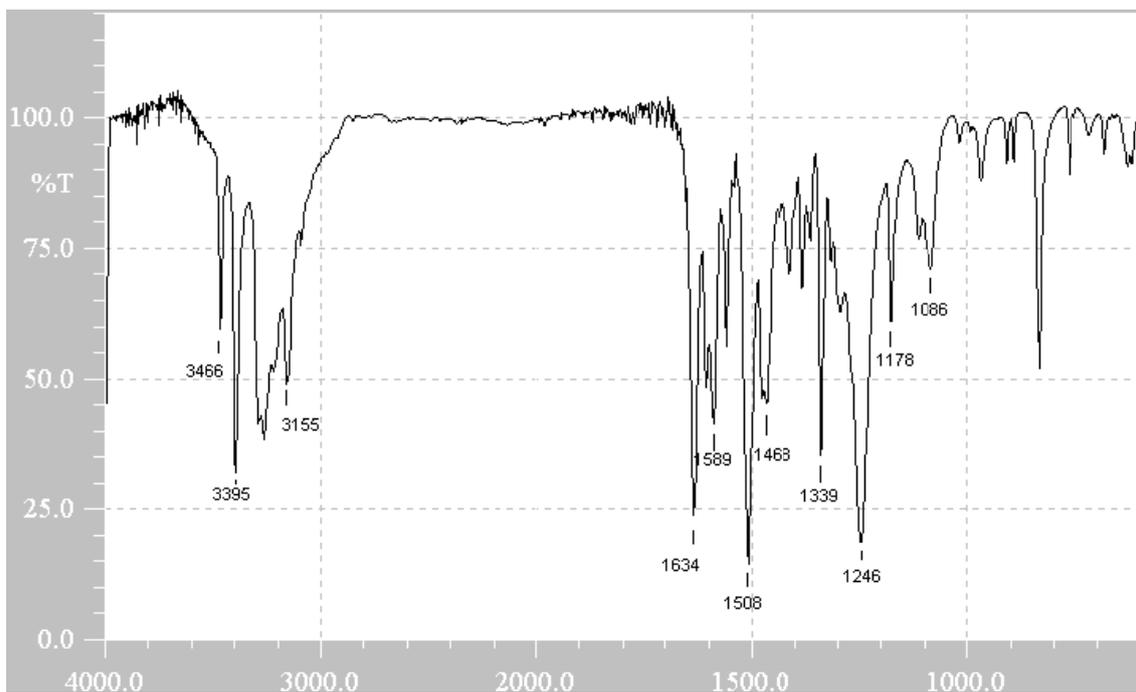
Composto TS2



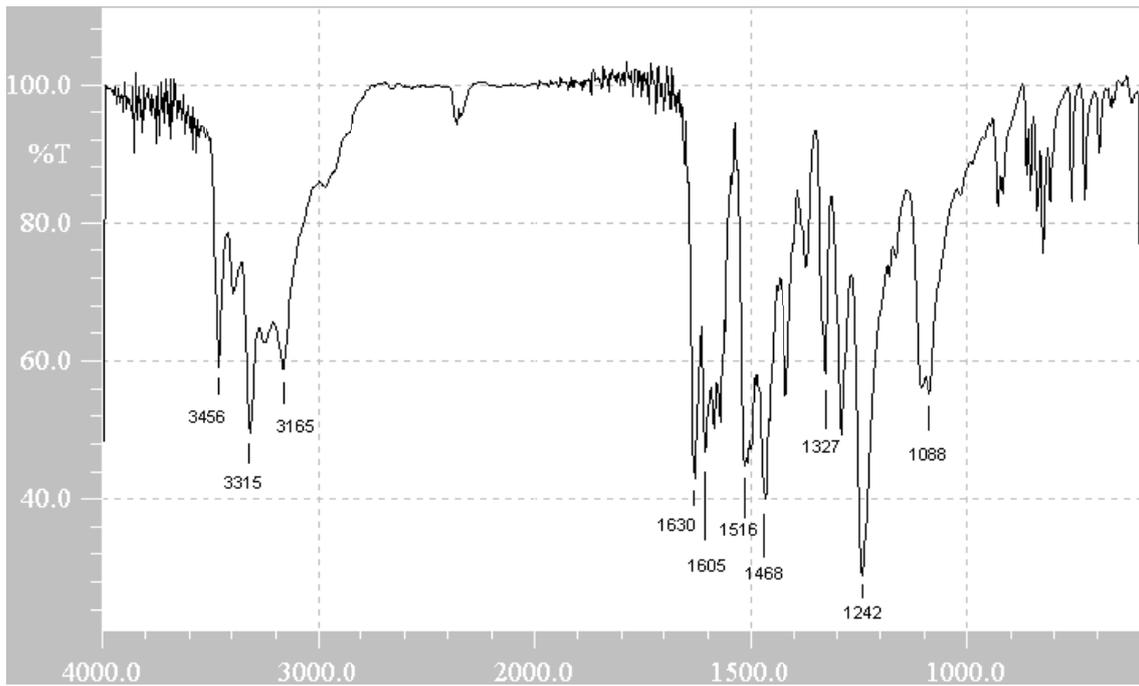
Composto TS3



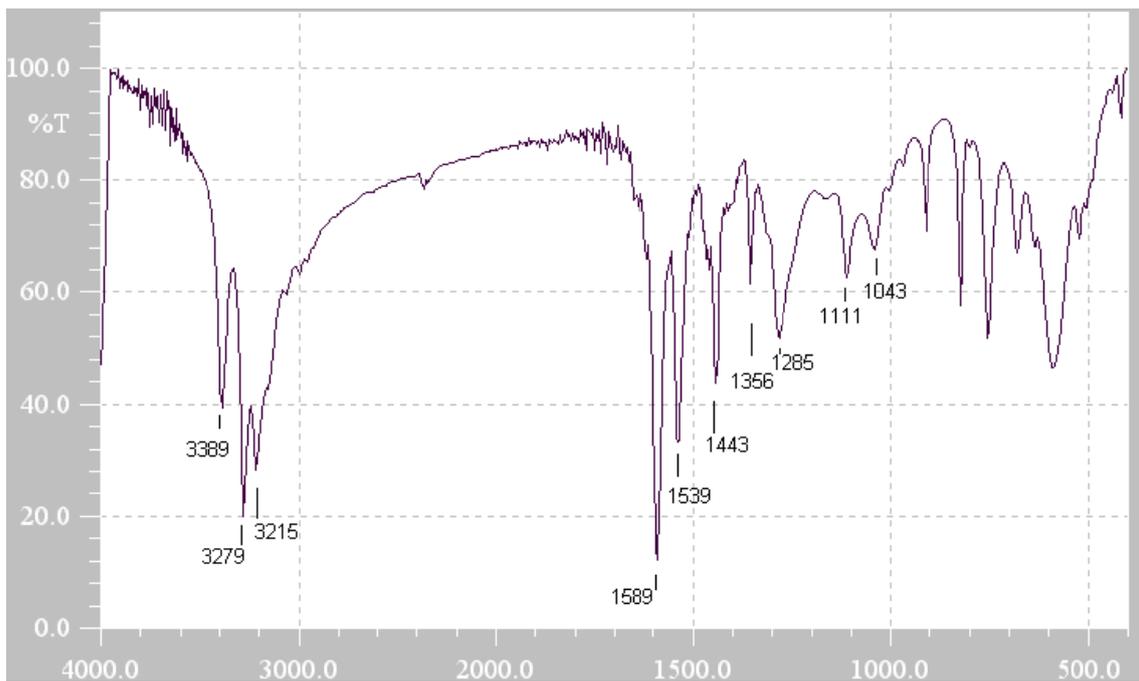
Composto TS4



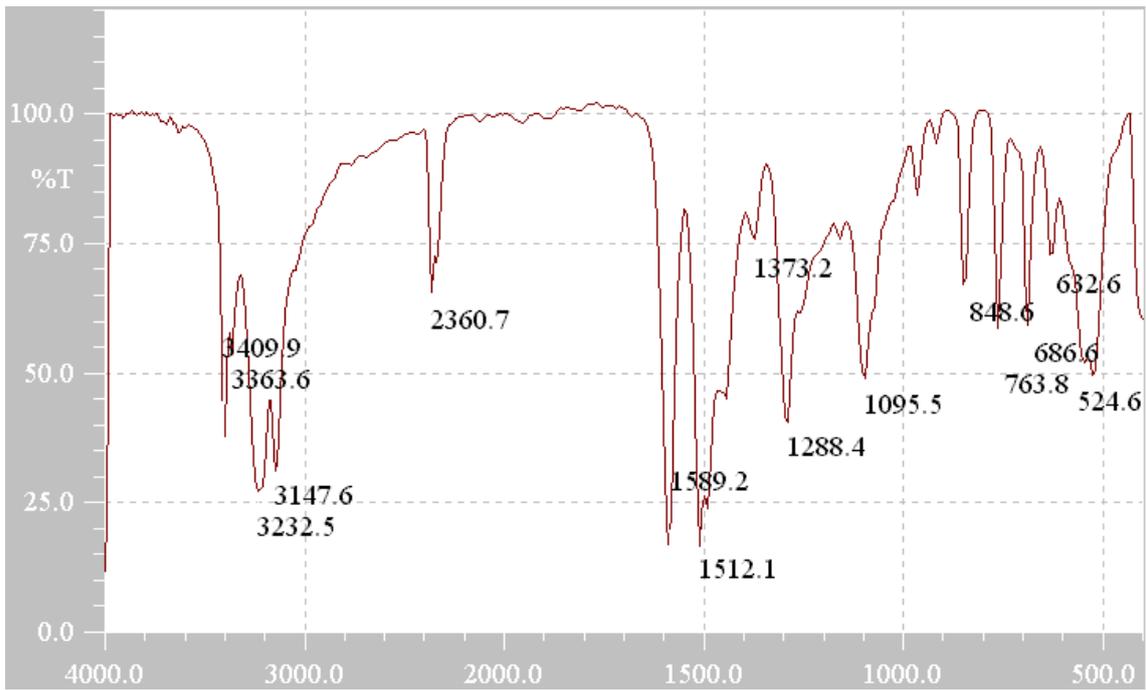
Composto TS5



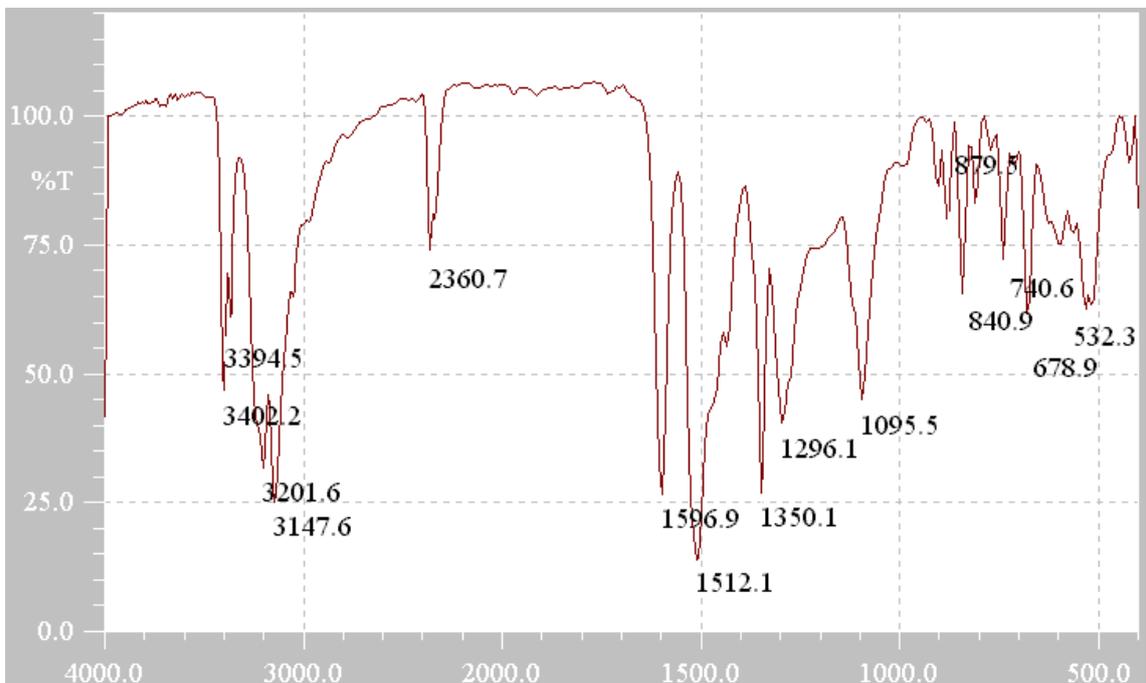
Composto TS6



Composto TS7



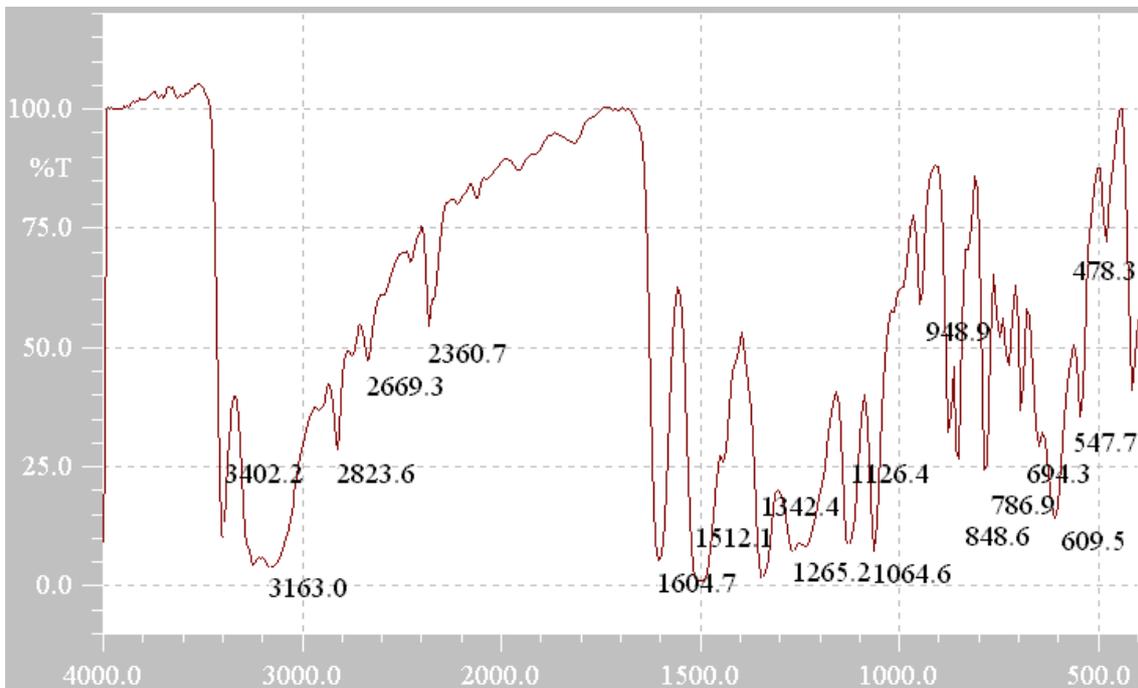
Composto TS8



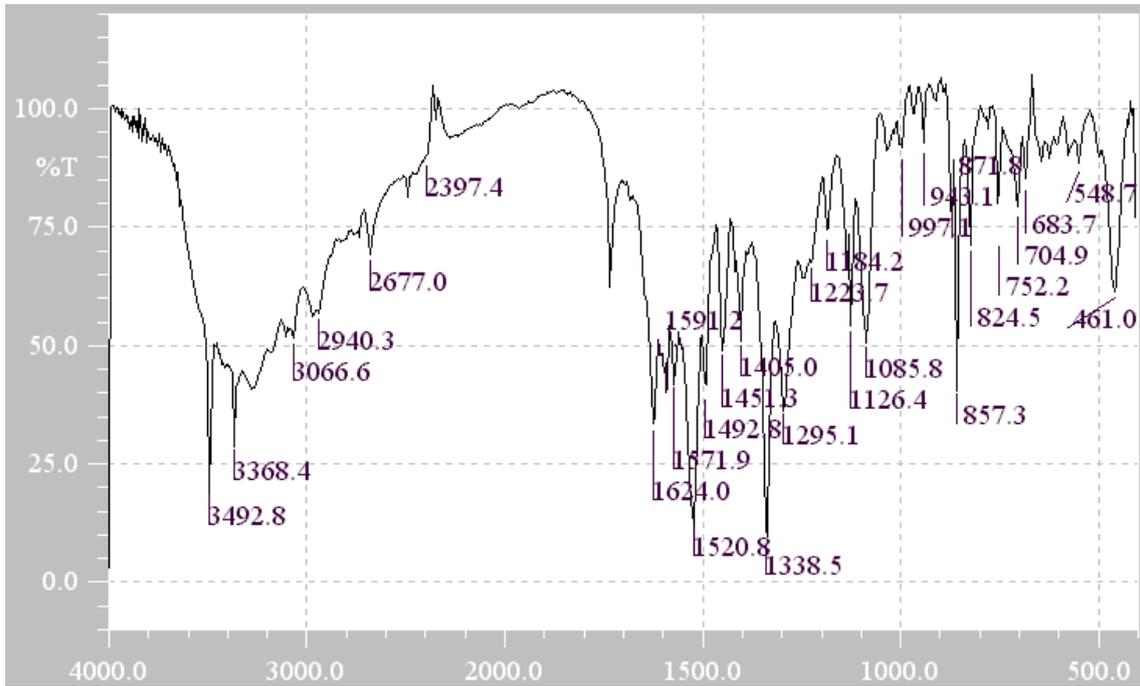
Composto TS9



Composto TS10



Composto MTS9

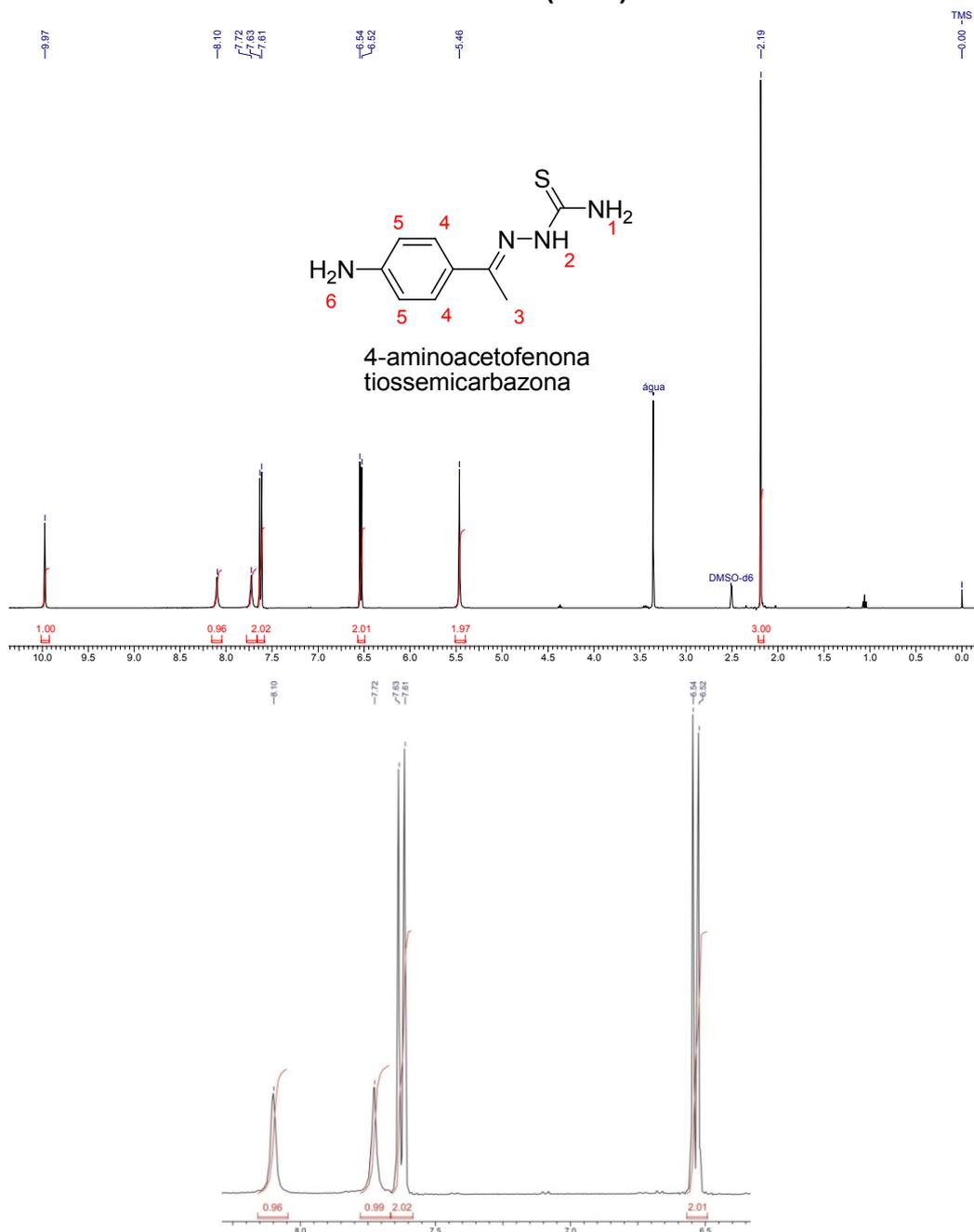


Composto MTS10



APÊNDICE B - Espectros de RMN

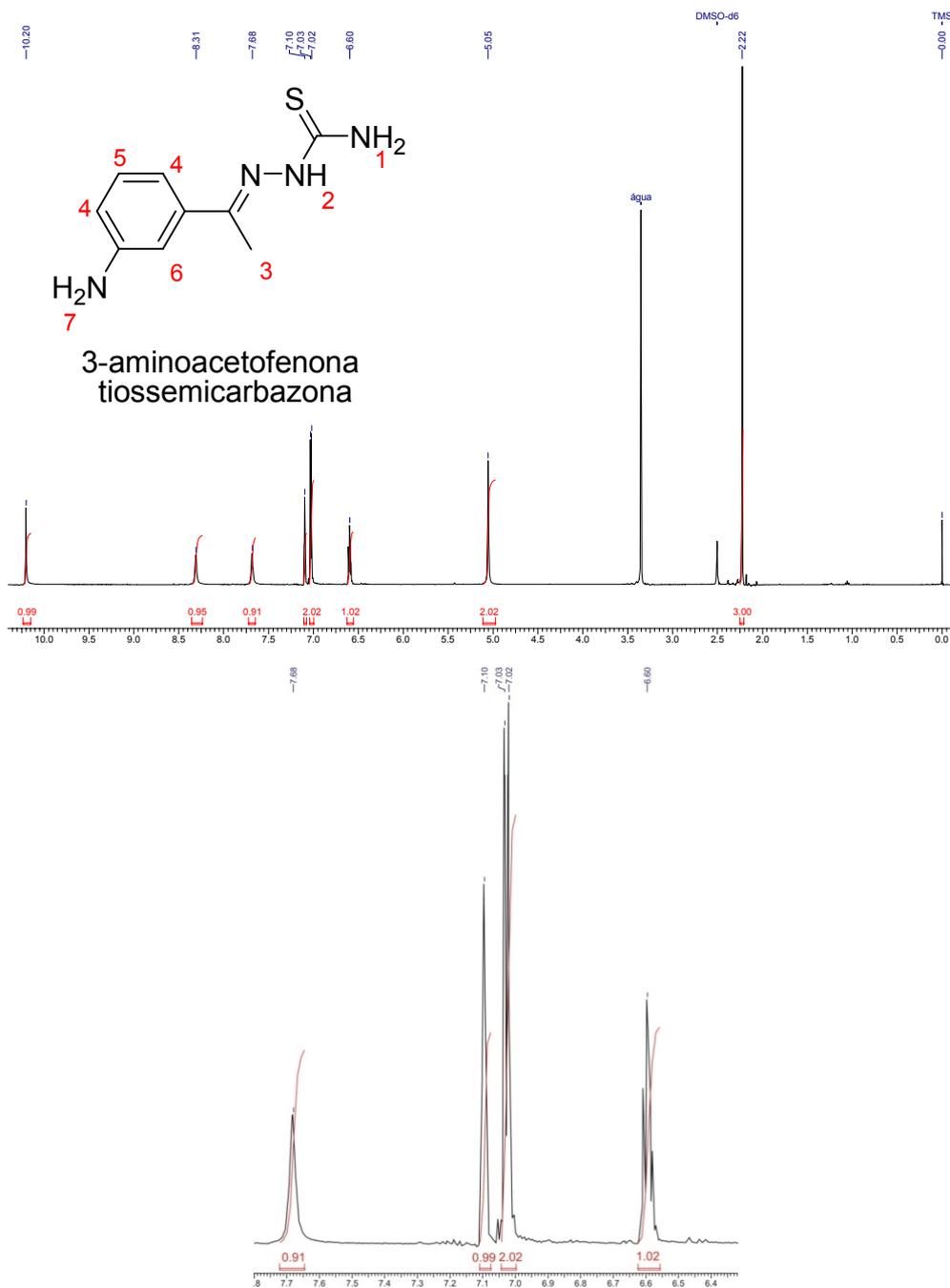
4-aminoacetofenona tiossemicarbazona (TS-1)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	1H, 7,72 s; 1H, 8,10 s	0,99; 0,96
2	1H, 9,97 s	1,00
3	3H, 2,19 s	3,00
4	2H, 6,53 d, $J=8,0$	2,01
5	2H, 7,62 d, $J=8,0$	2,02
6	2H, 5,46 s	1,97

Espectro de RMN ^1H do composto 4-aminoacetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (400 MHz, DMSO- d_6)

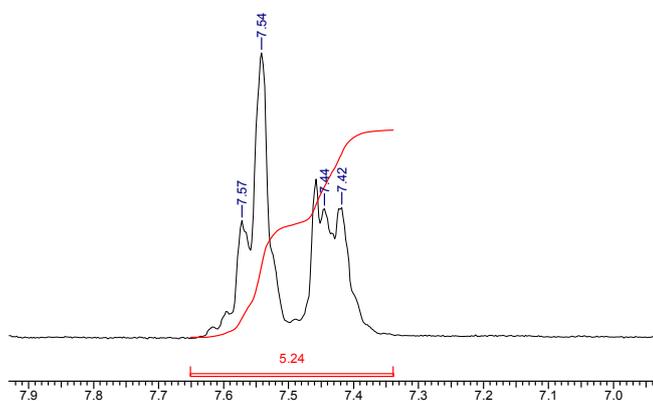
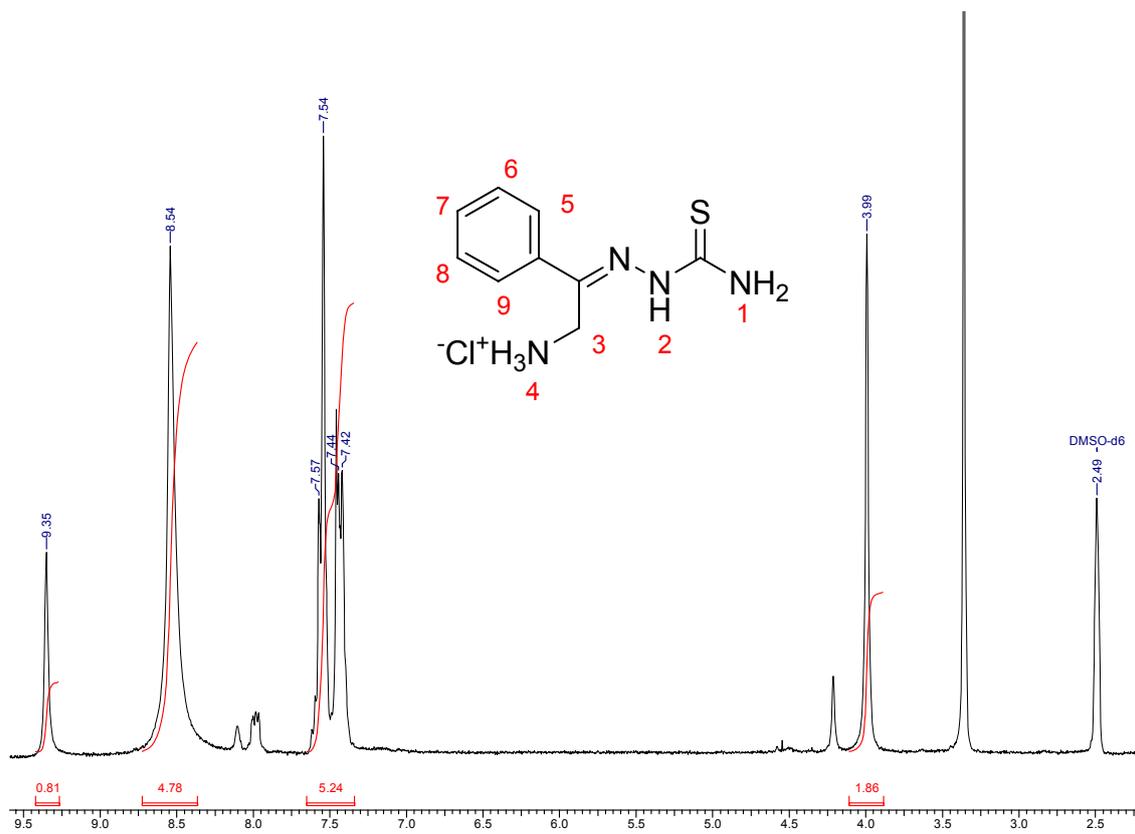
3-aminoacetofenona tiossemicarbazona (TS-2)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	1H, 7,68 s; 1H, 8,31 s	0,91;0,95
2	1H, 10,20 s	0,99
3	3H, 2,22 s	3,00
4	2H, 7,03 d $J=8,0$	2,02
5	1H, 6,60 t $J=8,0$	1,02
6	1H, 7,10 s	1,00
7	2H, 5,05 s	2,02

Espectro de RMN ^1H do composto 3-aminoacetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (400 MHz, DMSO-d6)

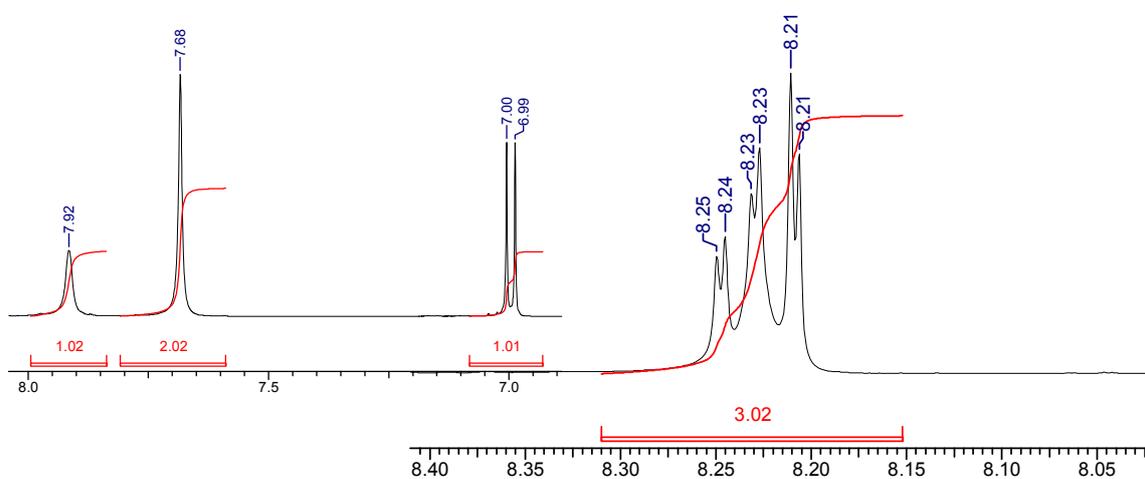
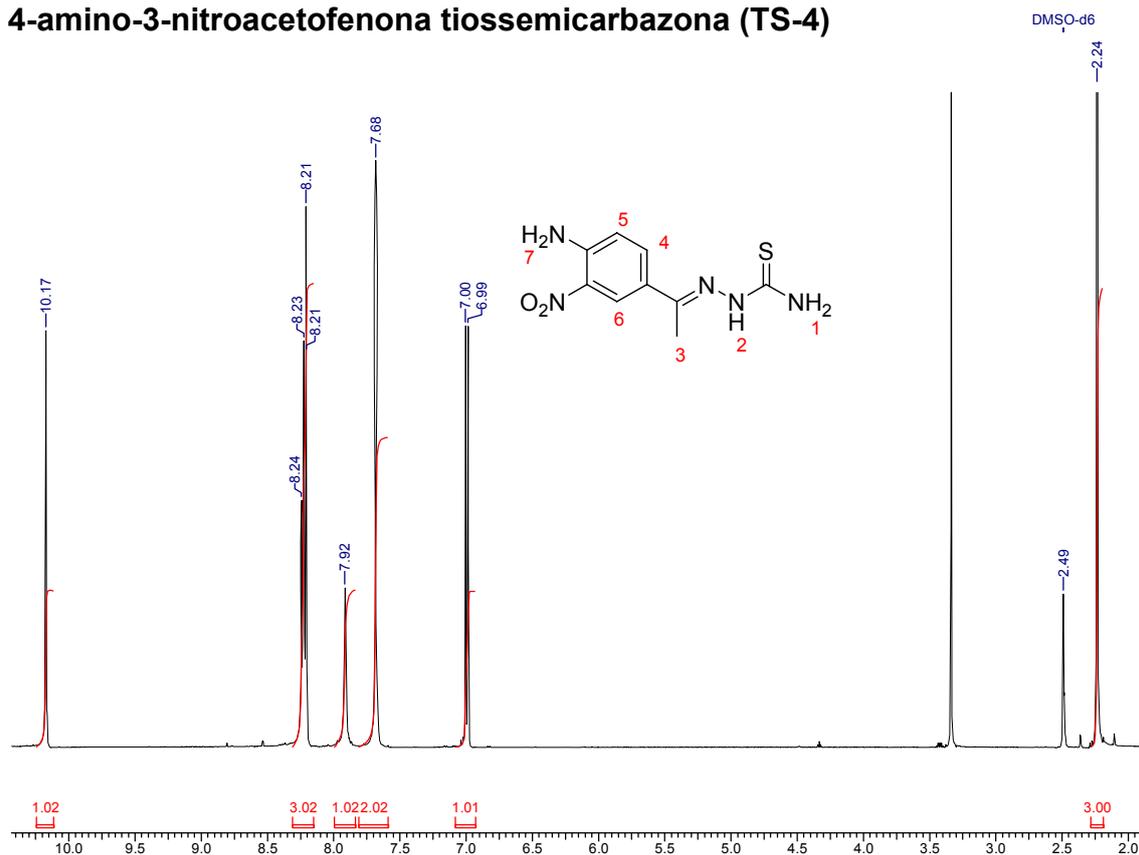
2-amino-1-feniletan-1-ona tiossemicarbazona (TS-3)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	2H, 8,54 sl	4,78
2	1H, 9,35 s	0,81
3	2H, 3,99 s	1,86
4	3H, 8,54 sl	4,78
5 a 9	5H, 7,42– 7,57 m	5,24

Espectro de RMN ¹H do composto 2-amino-1-feniletan-1-ona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (200 MHz, DMSO-d₆)

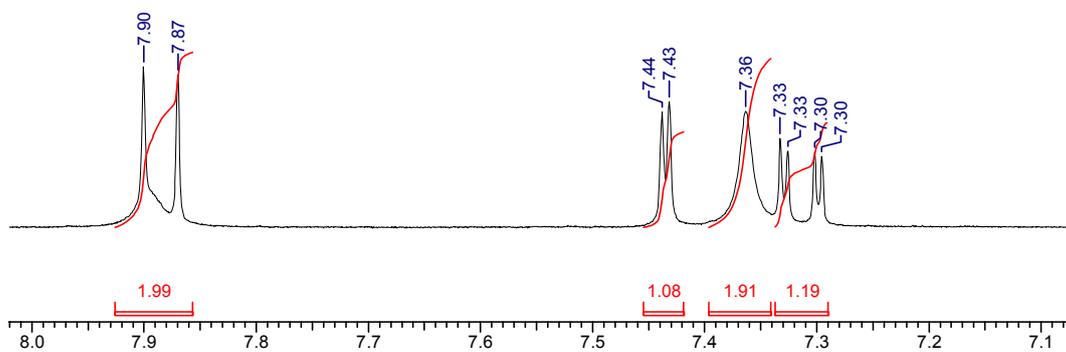
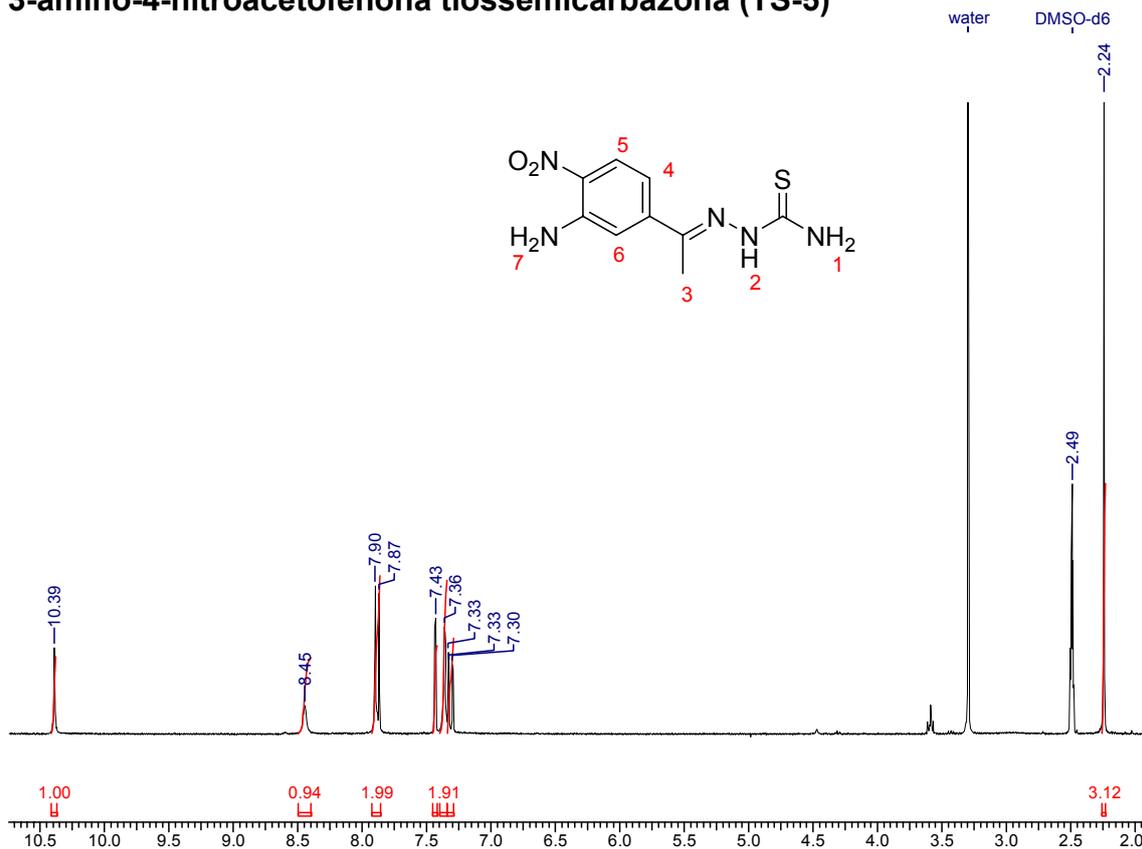
4-amino-3-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-4)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	2H, 8,21 – 8,25 m	3,02
2	1H, 10,17 s	1,02
3	3H, 2,24 s	3,00
4	1H, 7,00 d $J=9,0$	1,01
5	1H, 8,21 – 8,25 m	3,02
6	1H, 7,92 s	1,02
7	2H, 7,68 s	2,02

Espectro de RMN ^1H do composto 4-amino-3-nitroacetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (500 MHz, DMSO-d6)

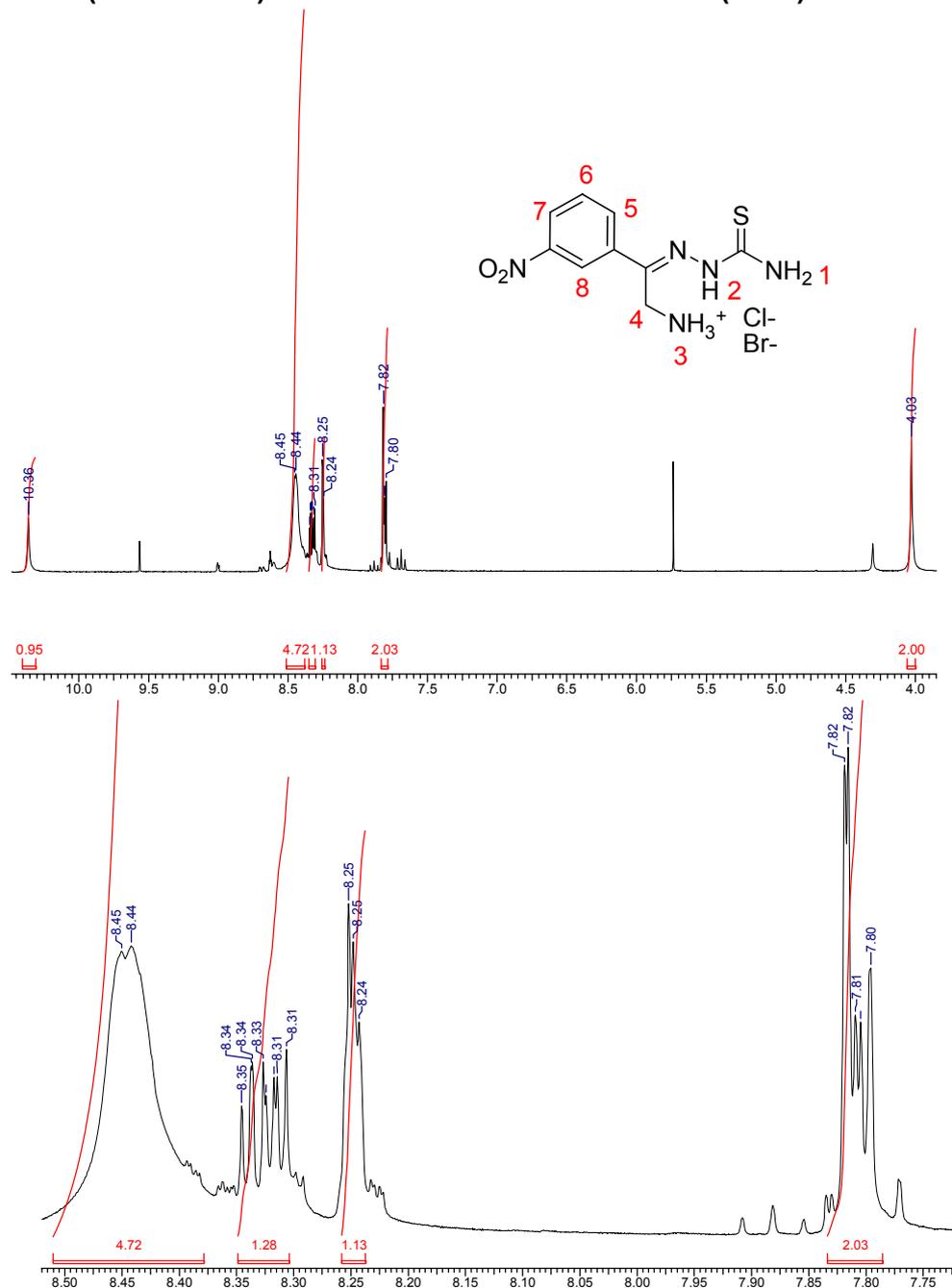
3-amino-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-5)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	1H, 7.90 s; 1H, 8.45 s	1.99; 0.94
2	1H, 10.39 s	1.00
3	3H, 2.24 s	3.12
4	1H, 7.31 dd $J=2.00$; 9,20	1,19
5	1H, 7.89 d $J=9,20$	1.99
6	1H, 7.44 d $J=2.00$	1.08
7	2H, 7.36 s	1.91

Espectro de RMN ¹H do composto 3-amino-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (500 MHz, DMSO-d₆)

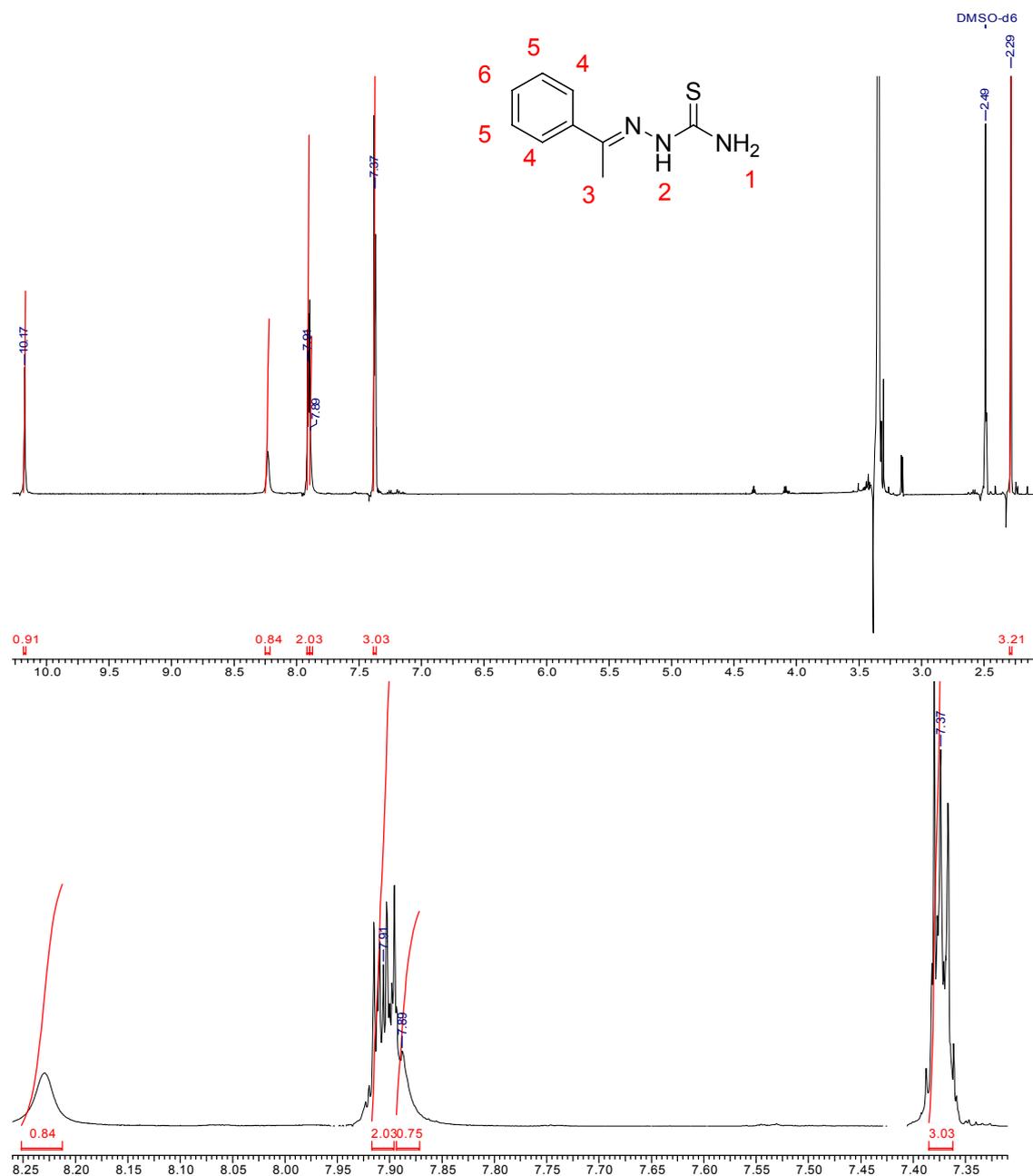
2-amino-1-(3-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona (TS-6)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	2H, 8,44 – 8,45 m	4,72
2	1H, 10,36 s	0,95
3	3H, 8,44 – 8,45 m	4,72
4	2H, 4,03 s	2,00
5 e 6	2H, 7,80 – 7,82 m	2,03
7	1H, 8,33 ddd $J=2,96; 3,20; 6,42$	1,28
8	1H, 8,25 dd $J=1,6; 2,96$	1,13

Espectro de RMN ^1H do composto 2-amino-1-(3-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (300 MHz, DMSO- d_6)

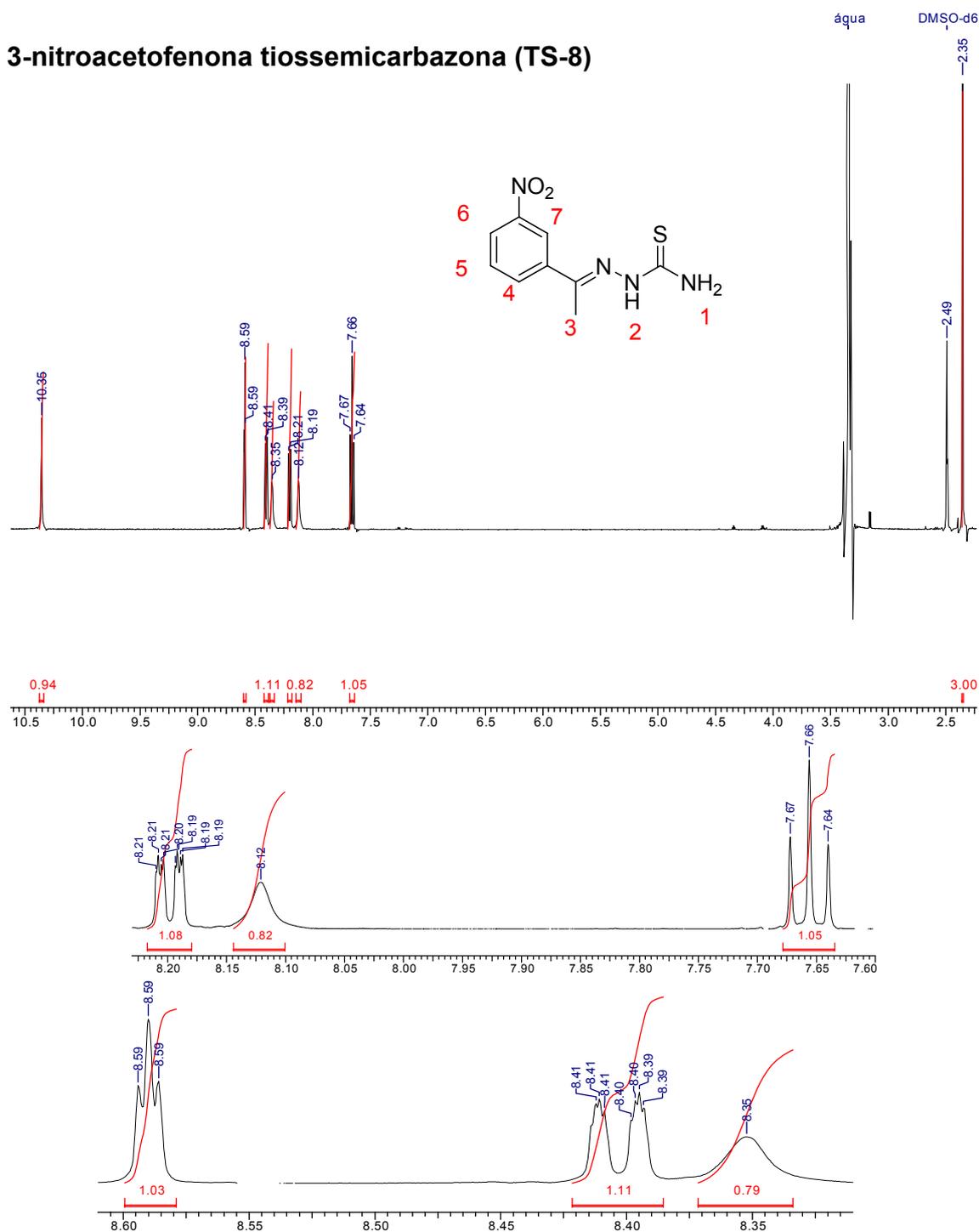
acetofenona tiossemicarbazona (TS-7)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	1H, 7,89 s; 1H, 8,25 s	0,75; 0,84
2	1H, 10,17 s	0,91
3	3H, 2,29 s	3,21
4	2H, 7,91 m	2,03
5 e 6	3H, 7,37 m	3,03

Espectro de RMN ^1H do composto acetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (500 MHz, DMSO-d6)

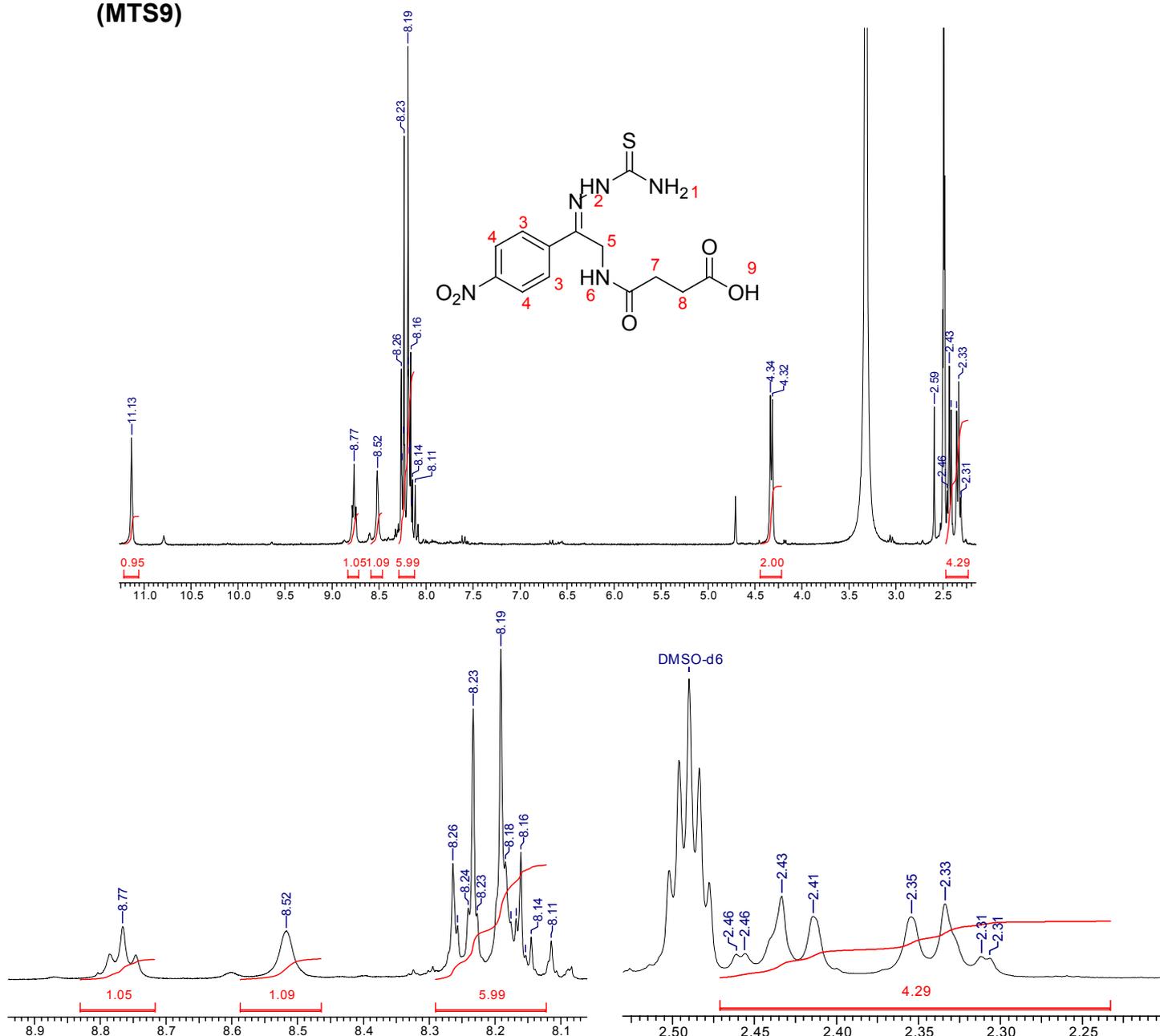
3-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-8)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	1H, 8,12 s; 1H, 8,35 s	0,82; 0,79
2	1H, 10,35 s	0,94
3	3H, 2,35 s	3,00
4	1H, 8,20 ddd $J=2,2; 2,2; 8,0$	1,08
5	1H, 7,66 t $J=8,0; 8,0$	1,05
6	1H, 8,40 ddd $J=2,2; 2,2; 8,0$	1,11
7	1H, 8,59 t $J=2,2; 2,2$	1,03

Espectro de RMN ^1H do composto 3-nitroacetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (500 MHz, DMSO-d6)

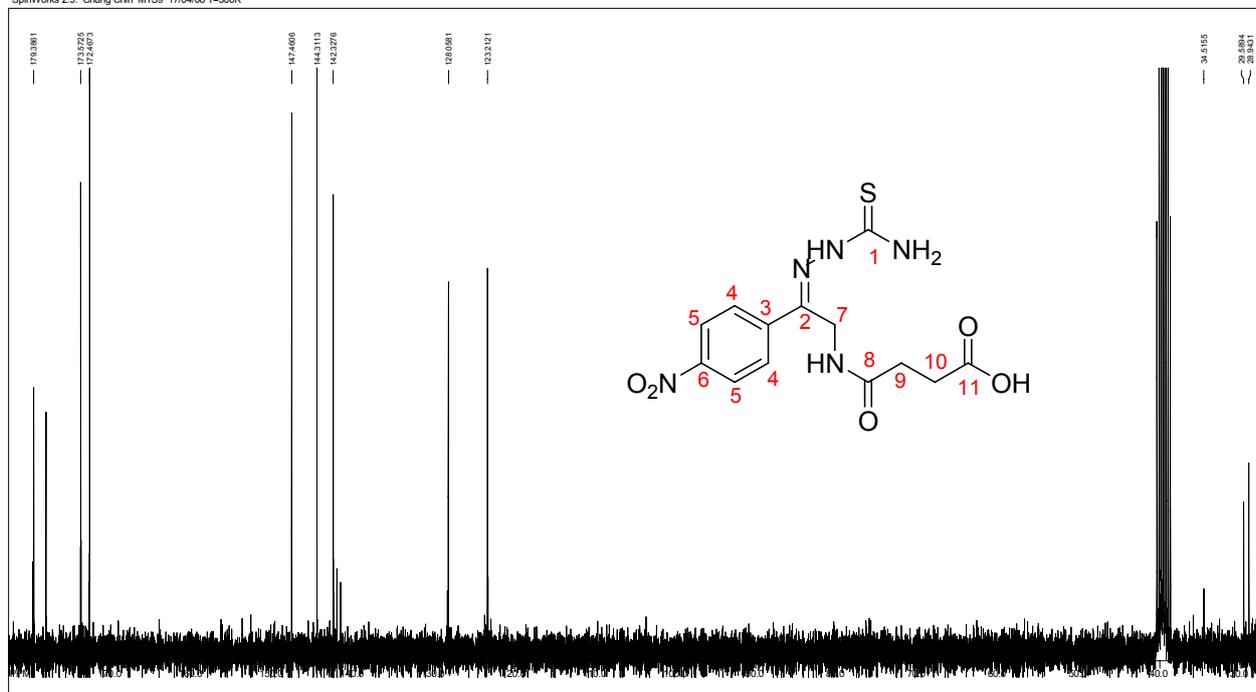
hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS9)



Espectro de RMN ^1H do composto hemissuccinato de 2-amino-1-(*p*-nitro)acetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (300 MHz, DMSO-d_6)

hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS9)

SpinWorks 2.5: Chung Chin MTS9 17/04/08 T=300K



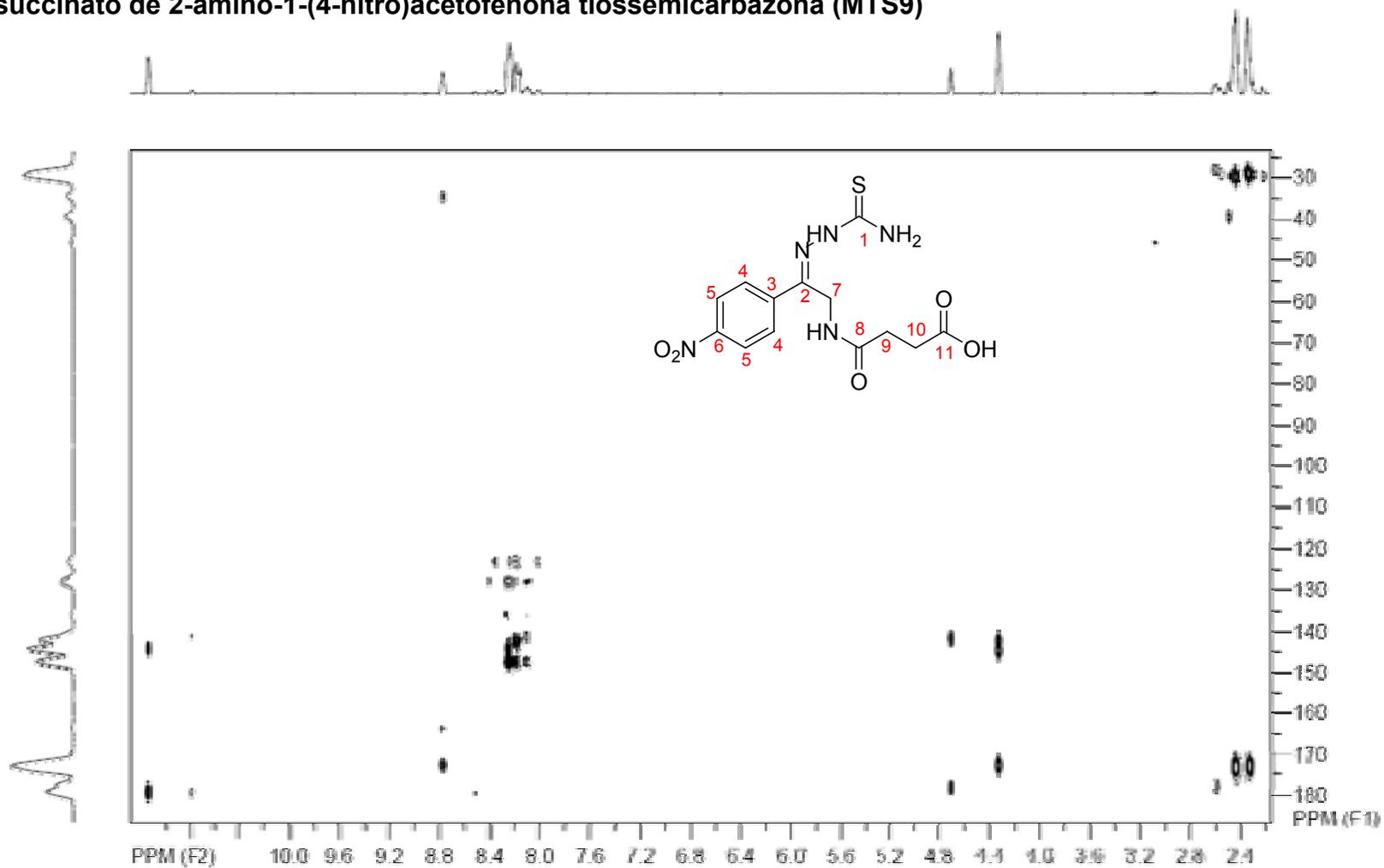
file: C:\Users\Franco\Desktop\RMN\MTS9\MTS9 carboni\456 exp1 -c2gqg30
 transmitter freq: 75.476050 MHz
 time domain size: 65536 points
 width: 15607.84 Hz = 209.788940 ppm = 0.209150 Hz/pt
 number of scans: 23412

freq. of 0 ppm: 75.467792 MHz
 processed size: 50768 complex points
 LR: 1.0001 GB 0.0000

Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)
1	179,36
2	144,30
3	142,32
4	128,04
5	123,20
6	147,44
7	34,51
8	172,45
9 e 10	29,58 e 28,94
11	173,55

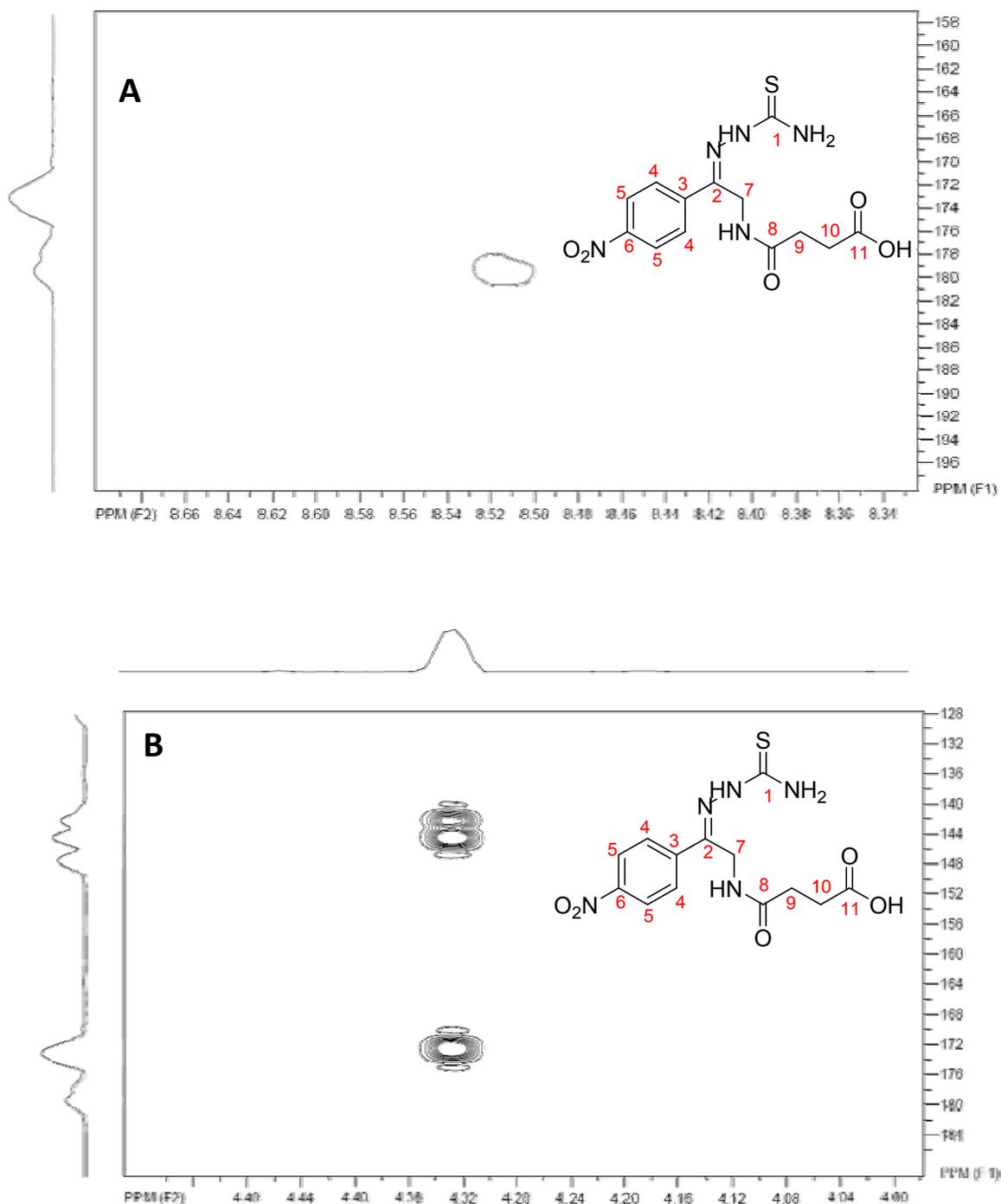
Espectro de RMN ¹³C do composto hemissuccinato de 2-amino-1-(*p*-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (300 MHz, DMSO-d₆)

hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS9)

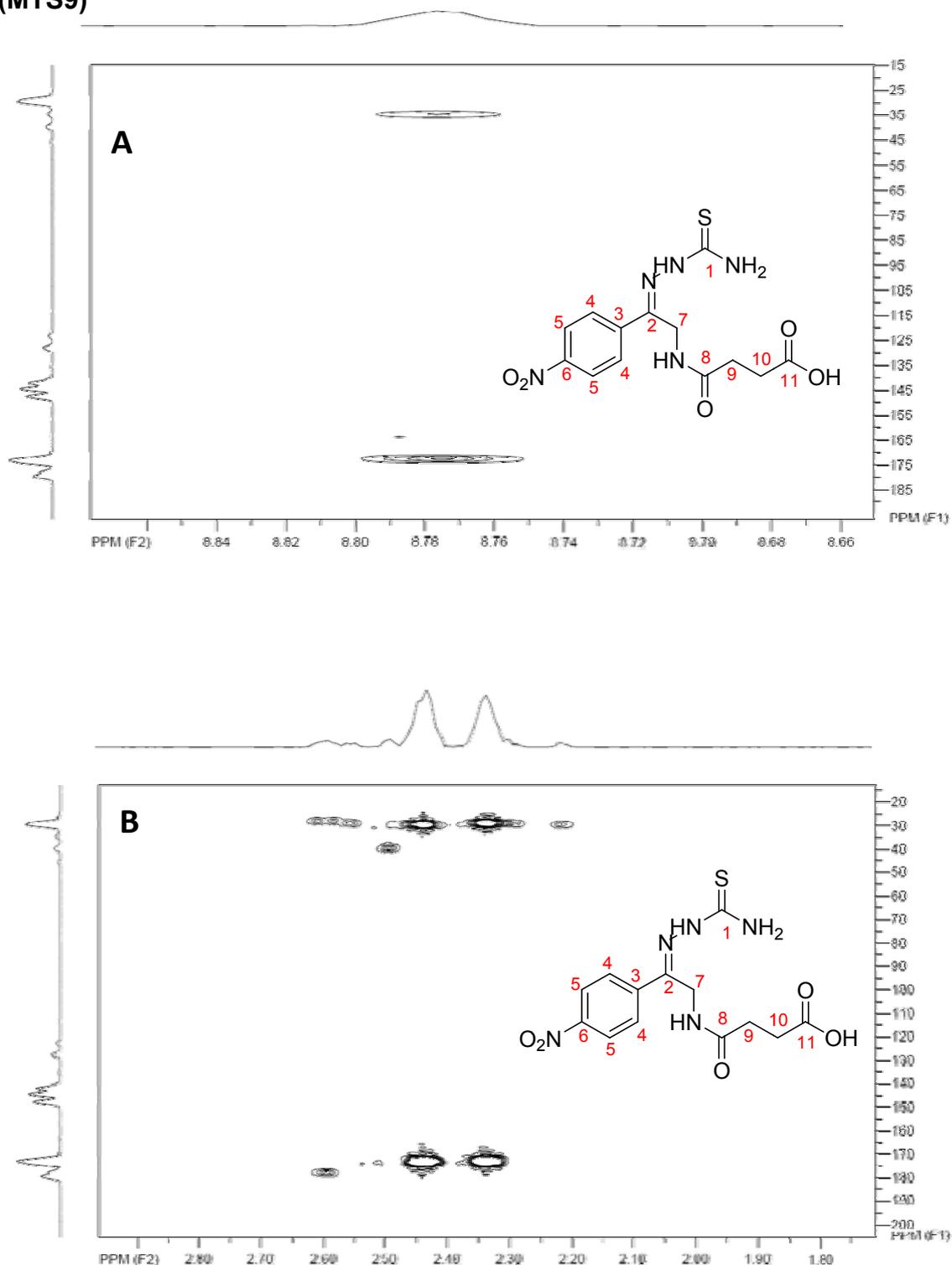


Espectro de RMN HMBC do composto MTS9 (500 MHz, DMSO-d6)

hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona
(MTS9)

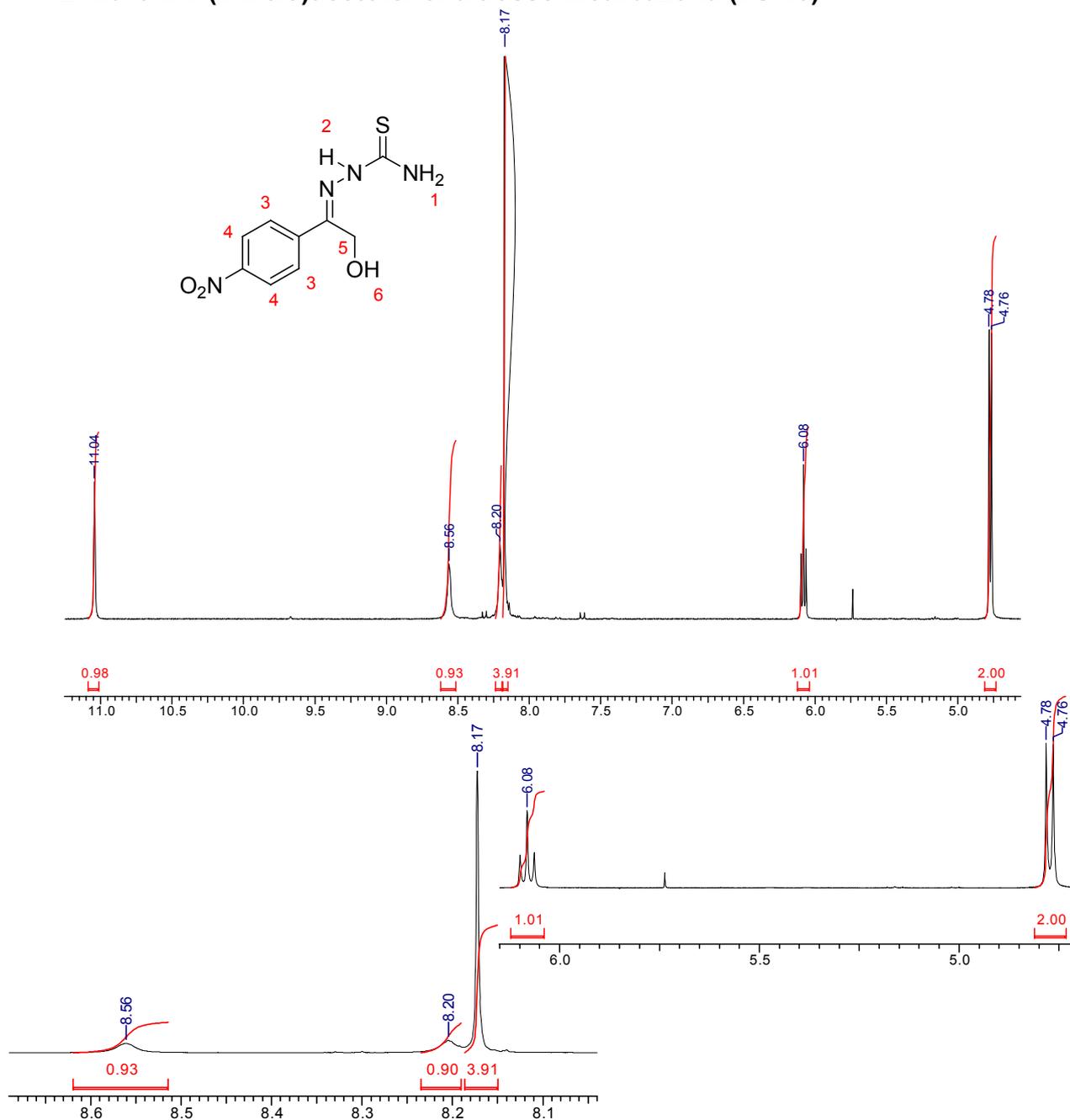


Espectro de RMN HMBC do composto MTS9 (500 MHz, DMSO-d₆). **A**) acoplamento do -NH- ($\delta=8,52$ ppm) com o carbono 1 ($\delta=179,36$ ppm). **B**) acoplamento do -CH₂- ($\delta=4,33$ ppm) com o carbono 3 ($\delta=142,32$ ppm), com o carbono 2 ($\delta=144,30$ ppm) e com o carbono 8 ($\delta=172,45$ ppm).

hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS9)

Espectro de RMN HMBC do composto MTS9 (500 MHz, DMSO-d₆). **A**) acoplamento do –C(O)-NH- ($\delta=8,77$ ppm) com o carbono 7 ($\delta=34,51$ ppm) e com o carbono 8 ($\delta=172,45$ ppm). **B**) acoplamento do –CH₂-CH₂- ($\delta=29,58$ e $28,94$ ppm) com os carbonos 9 e 10 ($\delta=29,58$ e $28,94$ ppm) e com o carbono 11 ($\delta=173,55$ ppm).

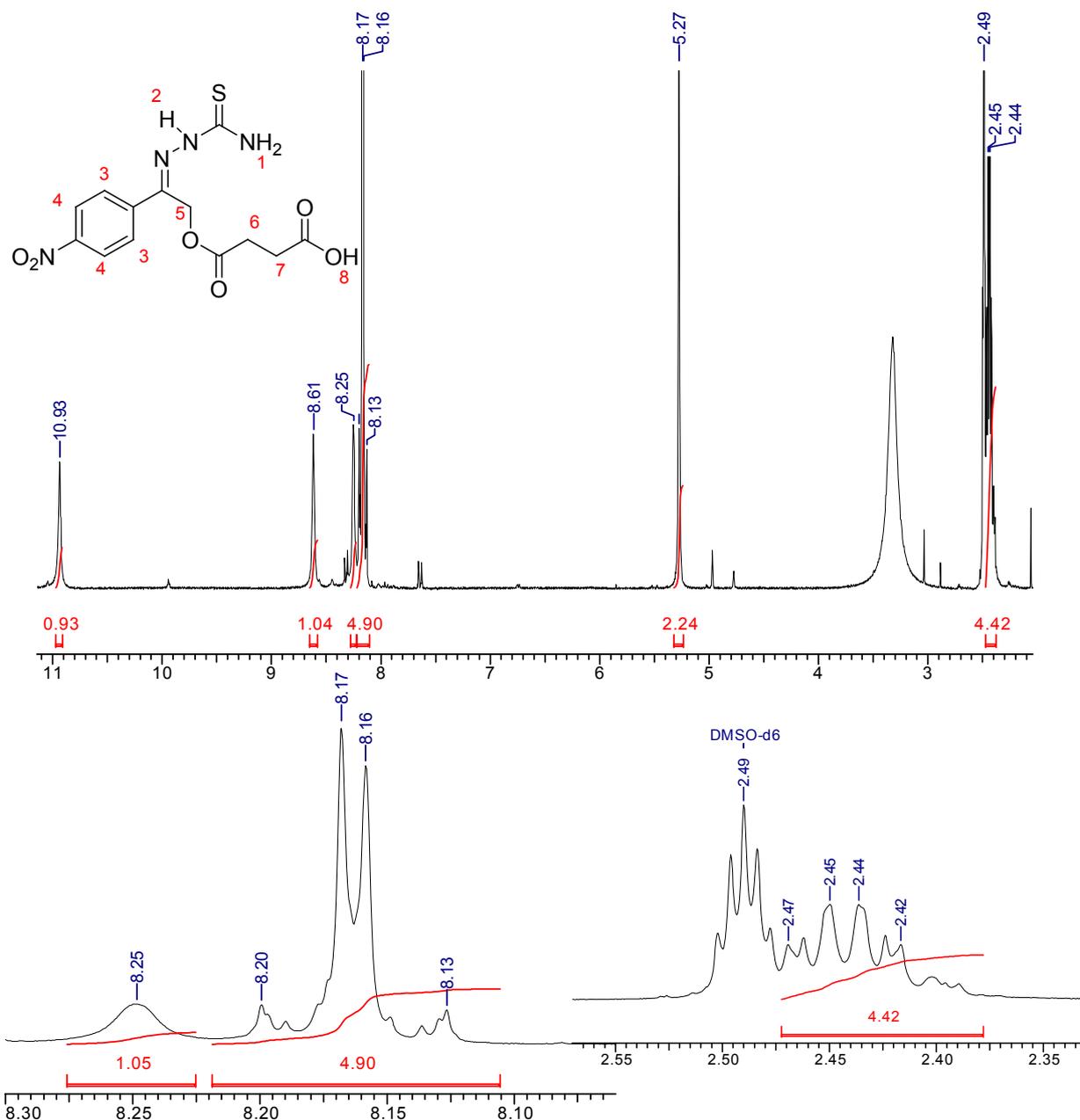
2-hidroxi-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (TS-10)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, J em Hz	Integração
1	1H, 8,2 s; 1H, 8,56 s	0,90; 0,93
2	1H, 11,04 s	0,98
3 e 4	4H, 8,17 s	3,91
5	2H, 4,77 d $J=5,3$ Hz	2,00
6	1H, 6,08 t $J=5,3$ Hz	1,01

Espectro de RMN ^1H do composto 2-hidroxi-1-(*p*-nitro)acetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (300 MHz, DMSO- d_6)

hemissuccinato de 2-hidroxi-1-(*p*-nitro)acetofenona tiossemicarbazona
(MTS-10)



Próton	$\delta^1\text{H}$ (ppm), mult, <i>J</i> em Hz	Integração
1	1H, 8,13 – 8,20 m; 1H, 8,25 s	4,90; 1,05
2	1H, 8,61 s	1,04
3 e 4	4H, 8,13 – 8,20 m	4,90
5	2H, 5,27 s	2,24
6 e 7	4H, 2,42 – 2,47 m	4,42
8	1H, 10,93 s	0,93

Espectro de RMN ¹H do composto hemissuccinato de 2-hidroxi-1-(*p*-nitro)acetofenona tiossemicarbazona e quadro de atribuições dos deslocamentos químicos (ppm) (300 MHz, DMSO-d6)

Apêndice C - Sequenciamento de aminoácidos

nanoanticorpos anti-J-18

```

                *           20           *           40           *           60           *           80           *
3J-1822 : QVQLQESGGGSVQAGGSLRSLCAVSGSTASTIRMGWFRQAPGKEREGVAAALYR--GSSTFYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMDSLKPEDT : 91
2J-1836 : QVQLQESGGGLVQPGGSLRSLCAVSGSTA--IRMGWFRQAPGKEREGVAALYRA--GSSTFYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNSLKPEDT : 89
2J-1822 : QVQLQESGGGSVQAGGSLRSLCAVSGYTYGSYCLAWFRQAPGKERTGVASLVTG--NGVTGYARSVEGRFTISPDKMKNTVYLQMNSLKPEDT : 91
3J-1816 : QVQLQESGGGSVQAGGSLRSLCAASGFTFNSGCVSWFRQAPGKEREGVAFINGR--RGTTYADDFVKGRFTISQDNAKNTVDLQMNSLQPGDT : 91
2J-184  : QVQLQESGGGSVQAGGSLRSLCTGSGYSFATDYMTWFRQIPGKEREGIATIHTSPERGDVHYADSVKGRFTISLHNARNTIYLLMNLKPEDT : 93
2J-1842 : QVQLQESGGGSVQAGGSLRSLCTGSGYSFATDYMTWFRQIPGKEREGIATIHTSPERGDVHYADSVKGRFTISLHNARNTIYLLMNLKPEDT : 93
2J-1846 : QVQLQESGGGSVQAGESLRLSCIGRGYTFATDYMTWFRQIPGKEREAVATIHTSPDRRDKYYADSVKGRFTISLDNAKNTIYLIMDNLKPEDT : 93
2J-1843 : QVQLQESGGGSVQAGGSLTSLCTGSGYSFATDYMTWFRQIPDKEREGVATIHTS--IGNIYYADSVKGRFTISLDNAKNTVYLQMNNVKPEDT : 91

                100           *           120           *           140
3J-1822 : AMYYCAARDSDFLYYPPTARRNYKYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 142
2J-1836 : AMYYCAARDSDFLYYPPTALRNYKYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 140
2J-1822 : AMYYCATKPG---TWNCAGEVN--YWQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 137
3J-1816 : AIYYCAADPP---ILGSACRFGSKYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 139
2J-184  : AMYYCALGPR----SGTWSSPNYKYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 140
2J-1842 : AMYYCALGPR----SGTWSSPNYKYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 140
2J-1846 : AMYYCALGPH----SG-WSEPSYKYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 139
2J-1843 : AMYYCALGPR----ADSWSSPDYKYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 138

```

Amarelo - PstI

Azul - BstEII

Rosa - Not I

Verde - tag (decapeptídeo)

Cinza - Eag I

Vermelho - framework - sequência constante

Azul - CDRs - sequência variável

nanoanticorpos anti-TS

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	
3TS40	:	QVQLQE	EAGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	TYVDSVKGRFTISLDNAKNTLYLEMNQMD	:	91		
2TS39	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	TYVDSVKGRFTISLDNAKNTLYLEMNQMD	:	91			
3TS17	:	QVQLQASGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	TYVDSVKGRFTISLDNAKNTLYLEMNQMD	:	91			
2TS13	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	TYVDSVKGRFTISLDNVKNTVYLEMNQMD	:	91			
2TS18	:	QVQLQEAGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGINTGVGR	TYVDSVKGRFTISLDNVKNTVYLEMNQMD	:	91			
3TS22	:	QVQLQEAGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	LYVDSVKGRFTISLDNAKNTVYLQMNQMD	:	91			
3TS24	:	QVQLQEAGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	LYVDSVKGRFTISLDNAKNTVYLQMNQMD	:	91			
2TS29	:	QVQLQEAGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGINTGVGR	LYVDSVKGRFTISLDNAKNTVYLQMNQMD	:	91			
3TS31	:	QVQLQEAGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQARGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	LYVDSVKGRFTISLDNAKNTVYLQMNQMD	:	91			
3TS26	:	QVQLQEAGGGSVQAGGSLNLS	CVGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGVNTGVGR	TYVDSVKGRFTISLDNAKNTVYLEMNQMD	:	91			
3TS14	:	QVQLQESGGGAVRNGGALKL	SCVSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGINTGVGR	TYVDSVKGRFTISLDNAKNTVYLEMNQMD	:	91			
3TS38	:	QVQLQESGGGSVQTGGSLRL	SCAGSGFPGN--	SRCLGWFRQAPGKEREAVAGIEGGTNTGVGR	TYANTVKGRFTISLDNAKNTVYLQMNQMD	:	91			
3TS12	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLRL	SCAASGYTYS--	RHSMWFRQAPGKEREAVAGIEGGTNTGVGR	TYANTVKGRFTISQDNDKNTVYLEMNSLK	:	87			
3TS37	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLRL	SCAASGYTYS--	RHSMWFRQAPGKEREAVAGIEGGTNTGVGR	TYANTVKGRFTISQDNDKNTVYLEMNSLK	:	87			
2TS37	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLRL	SCAASAYS--	SVCMGWFRQPPGKEREAVAGIEGGTNTGVGR	TYANTVKGRFTISQDNDKNTVYLEMNSLK	:	84			
2TS1	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLRL	SCAASGYTYS--	TYMFWFRQAPGKERDGVV--	AIISIGAGTTYADSVKGRFTISQESAKNTVHLQMNQMD	:	87			
3TS16	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLRL	SCLASRITYSPDNYCMAWFRQVPGKERELVT--	SINNNGGRTTYADSVNGRFTISQDNTKHTMYLQMNQMD	:	89				
2TS16	:	QVQLQESGGGSVQAGGSLRL	SCAASGTFN--	SGCVSWFRQAPGKEREAVAGIEGGTNTGVGR	TYADSVKGRFTISQDNDKNTVYLEMNSLK	:	87			

nanoanticorpos anti-TS (continuação)

```

          100          *          120          *          140
3TS40 : SEDTATYYCAAII---SFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
2TS39 : FEDTATYYCAAII---SFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS17 : FEDTATYYCAAII---TFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
2TS13 : FEDTATYYCAAII---TFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
2TS18 : FEDTATYYCAAII---TFAQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS22 : FEDTATYYCAAII---SFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS24 : FEDTATYYCAAII---SFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
2TS29 : FEDTATYYCAAII---SFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS31 : FEDTATYYCAAII---TFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS26 : FEDTATYYCAAII---TFGQCNEWGQYKSWGPGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS14 : FEDTATYYCAAII---TFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS38 : FEDTATYYCAAII---SFGQCNEWGQYKSWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
3TS12 : PEDTAMYYCAASTRPLFFWRLGRETDYTYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 142
3TS37 : PEDTAMYYCAASTRPLFFWRLGRETDYTYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 142
2TS37 : PEDTAIYYCAART-AYCSGTLFTPSSYNFWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 138
2TS1  : PEDTGIYYCAAGPKEVIFGQLN-PNRYNYWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 141
3TS16 : LEDTATYYCAAKLRDNYDG-LCLGTDFRWWGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 143
2TS16 : PGDTAIYYCAADP-PILGSACRFGSKY--WGQGTQVTVSSGRYPYDVPDYGSGRA : 139

```

Amarelo - PstI

Azul - BstEII

Rosa - Not I

Verde - tag (decapeptídeo)

Cinza - Eag I

Vermelho - framework - sequência constante

Azul - CDRs - sequência variável

ANEXO A

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA SÍNTESE DE COMPOSTOS ANTICHAGÁSICOS

A1. Procedimentos Sintéticos

A1.1. Síntese do composto 4-aminoacetofenona tiossemicarbazona (TS-1)

Uma mistura de 1,352 g (0,01 mol) de 4-aminoacetofenona e 0,91 g (0,01 mol) de tiossemicarbazida em 25 mL de etanol foi acidificada com 2 mL de ácido acético para pH entre 3 e 4. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas, e então o solvente foi removido por evaporação à pressão reduzida. O produto obtido foi lavado a quente com solução saturada de bicarbonato de sódio para eliminação dos produtos de partida, e então lavado com água e seco em estufa a 70 °C. A reação foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como fase móvel 50% de acetona em diclorometano. O produto foi analisado por infravermelho e RMN ¹H para confirmação estrutural e apresentou faixa de fusão entre 185 e 186 °C e obteve-se 1,87 g (90% de rendimento).

A1.2. Síntese do composto 3-aminoacetofenona tiossemicarbazona (TS-2)

Uma mistura de 1,352 g (0,01 mol) de 3-aminoacetofenona e 0,91 g (0,01 mol) de tiossemicarbazida em 25mL de etanol foi acidificada com 2 mL de ácido acético para pH entre 3 e 4. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas, e então o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida. O produto obtido foi lavado a quente com solução saturada de bicarbonato de sódio para eliminação dos produtos de partida, e então lavado com água e seco em estufa a 70 °C. A reação foi

acompanhada por CCD, utilizando-se como fase móvel 50% de acetona em diclorometano. O produto foi analisado por infravermelho e RMN ^1H para confirmação estrutural e apresentou como faixa de fusão 150 a 151 °C e obteve-se 1,77 g (85% de rendimento).

A1.3. Síntese do composto 2-amino-1-feniletan-1-ona tiossemicarbazona (TS-3)

Uma mistura de 0,5 g (3,7 mmol) de fenacilamina e 0,337 g (3,7 mmol) de tiossemicarbazida em 9,3 mL de etanol, foi acidificada com 0,74 mL de ácido acético para pH entre 3 e 4. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 48 horas, e então o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida, o produto foi recristalizado em metanol para eliminação dos produtos de partida, e então seco em estufa a 70 °C. A reação foi acompanhada por CCD, utilizando-se como fase móvel 50% de acetona em diclorometano. O produto foi analisado por infravermelho e RMN ^1H para confirmação estrutural e apresentou como faixa de fusão 179 a 180 °C e obteve-se 0,59 g (65% de rendimento).

A1.4. Síntese do composto 4-amino-3-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-4)

Obtenção do composto 4-N-acetilaminoacetofenona

Foi adicionado 5,0 g (37 mmol) de 4-aminoacetofenona aos poucos em 50 mL de anidrido acético em banho de gelo e álcool para que a temperatura não ultrapassasse 30 °C. Esta reação foi mantida a esta temperatura por uma hora. Após este período jogou-se 200 mL de água gelada na reação. O produto precipitado foi filtrado e recristalizado em 40 mL de etanol. A reação foi acompanhada por CCD utilizando como fase móvel clorofórmio:acetato de etila (2:1) e a placa de CCD revelada com solução de ninidrina 2% em etanol.

Obtenção do composto 4-N-acetilamino-3-nitroacetofenona

Em um béquer contendo 10 mL de ácido nítrico concentrado (99,5%) resfriado em banho de gelo e álcool foram adicionados 0,8 g (4,5 mmol) de 4-N-acetilaminoacetofenona lentamente de modo que a temperatura não ultrapassasse 5 °C. A reação foi mantida sob agitação por 1 hora e colocada em 60 g de mistura de água e gelo. O precipitado foi lavado com água gelada e filtrado a vácuo. A reação foi acompanhada por CCD utilizando como fase móvel clorofórmio / acetato de etila (2:1).

O produto foi então submetido a cromatografia líquida em coluna de sílica gel empregando como fase móvel inicialmente 100% de diclorometano e posteriormente mistura de 5% de acetato de etila em diclorometano.

Obtenção do composto 4-amino-3-nitroacetofenona

0,6 g (2,7 mmol) do composto purificado 4-N-acetilamino-3-nitroacetofenona foi submetido a desacetilação utilizando ácido clorídrico 6 N em refluxo durante 4 horas, levando a total solubilização do produto. A reação foi transferida para um béquer e com o auxílio de um banho de gelo foi adicionado gota-a-gota uma solução aquosa 50% de NaOH até pH 7,0. A suspensão foi filtrada, lavada com água e seca em dessecador sob pentóxido de fósforo.

Obtenção do composto 4-amino-3-nitroacetofenona tiossemicarbazona

Em um balão adicionou-se 0,422 g (2,3 mmol) de 4-amino-3-nitroacetofenona, 0,5 mL de ácido acético glacial e 0,213 g (2,3 mmol) de tiossemicarbazida em 50 mL de etanol. A reação foi mantida sob refluxo por 48 horas e foi acompanhada por CCD utilizando como fase móvel 5% de acetato de etila em diclorometano. O produto final foi isolado em sua forma pura por filtração da mistura reacional seguido de lavagem com água destilada, sendo analisado por infravermelho e RMN ¹H e apresentou como faixa de fusão 231 a 232 °C e obteve-se 0,46 g (77% de rendimento).

A1.5. Síntese do composto 3-amino-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-5)

Obtenção do composto 3-N-acetilaminoacetofenona

Em um béquer de 250 mL contendo 50 mL de anidrido acético resfriado com auxílio de banho de gelo e álcool foram adicionados 5 g (37 mmol) de 3-aminoacetofenona aos poucos de modo que a temperatura não ultrapassasse 10 °C. Após a adição a reação foi deixada a alcançar a temperatura ambiente e permaneceu sob agitação por 2 horas. Após este período a reação foi vertida sobre 80 mL de mistura de água e gelo e então neutralizada pela adição de bicarbonato de sódio. O precipitado foi filtrado, lavado com água e seco em dessecador sob pentóxido de fósforo. A reação foi acompanhada por CCD utilizando como fase móvel mistura de clorofórmio:acetona (2:1).

Obtenção do composto 3-N-acetilamino-4-nitroacetofenona

Em um béquer de 250 mL contendo 10 mL de anidrido acético resfriado com auxílio de banho de gelo e álcool adicionou-se com o auxílio de funil de adição ácido nítrico concentrado (99,5%) gota-a-gota, de modo que a temperatura não ultrapassasse 10 °C. Após a adição do ácido nítrico, esperou-se a temperatura alcançar 0 °C para começar a adição do 3-N-acetilaminoacetofenona de modo que a reação permanecesse entre 5 e 10 °C. Após completa solubilização esperou-se 10 minutos na mesma faixa de temperatura para que a reação fosse vertida em 80 mL de mistura de água e gelo. O precipitado foi lavado com água e purificado por cromatografia líquida em coluna de sílica gel utilizando como fase móvel mistura 50% de clorofórmio em éter etílico.

Obtenção do composto 3-amino-4-nitroacetofenona

680 mg (3,06 mmol) do composto 3-N-acetilamino-4-nitroacetofenona (com r_f 0,6 fase móvel 50% de clorofórmio em éter etílico) foi desacetilado utilizando 10 mL de ácido clorídrico 6 N mantido por 4 horas sob refluxo. A solução foi mantida resfriada por 24 horas gerando um precipitado escuro, o qual foi removido por filtração.

Obtenção do composto 3-amino-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona

500 mg (2,78 mmol) do produto obtido foram adicionados em 10 mL de etanol, seguido da adição de 0,5 mL de ácido acético glacial e 279 mg (3,06 mmol) de tiossemicarbazida. A reação foi mantida sob refluxo por 48 horas e então se evaporou a pressão reduzida o solvente. O resíduo obtido foi lavado com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio a quente, filtrado, lavado com água e seco em dessecador sob pentóxido de fósforo. O produto obtido foi analisado por infravermelho e RMN ¹H e apresentou como faixa de fusão 219 a 220 °C e obteve-se 0,44 g (75% de rendimento).

A1.6. Síntese do composto 2-amino-1-(3-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona (TS-6)

Síntese do composto m-nitroacetofenona

Preparou-se uma *solução nitrante* por lenta adição de 8 mL de ácido sulfúrico concentrado (d=1,84 g/mL) para 5,3 mL de ácido nítrico concentrado (d=1,42 g/mL) em erlenmeyer de 150 mL com resfriamento com banho de gelo/álcool/NaCl. Em outro erlenmeyer de 500 mL, colocou-se 20 mL de ácido sulfúrico concentrado e resfriou-se a 0 °C com banho de gelo/álcool/sal. A este erlenmeyer adicionou-se com auxílio de funil de adição, 8 mL de acetofenona, de modo que a temperatura não excedesse 5 °C. A solução resultante foi resfriada a -5 °C, e então adicionou-se gota-a-gota, através de funil de adição, a solução nitrante, mantendo a temperatura em 0°C ou abaixo. Após a adição, a reação foi mantida por 10 a 15 minutos nesta mesma temperatura. À solução resultante foi adicionado uma mistura de 100 g de gelo picado e 150 mL de água sob agitação. O produto foi separado como um sólido amarelo, e então lavado com 5 mL de etanol gelado e ressecado com 13 mL de etanol, obtendo-se 6,2 g (55% de rendimento).

Síntese do composto α-bromo-m-nitroacetofenona

Em um balão de duas bocas de 500 mL, adicionou-se 300 mL de ácido acético glacial e 8 g (48,32 mmol) de *m*-nitroacetofenona. Esta mistura foi

aquecida a 55 °C, e a ela adicionou-se 2,5 mL (48,08 mmol) de bromo, gota-a-gota lentamente através de funil de adição, de modo que a coloração gerada se dissipasse antes da adição da próxima gota. Após a completa adição do bromo, a reação permaneceu por 30 minutos nesta mesma temperatura, e então adicionou-se sobre esta reação 101 g de gelo picado. O precipitado formado foi removido por filtração a vácuo e lavado com 100 mL de água. O produto foi recristalizado em etanol/éter de petróleo.

A reação foi acompanhada por CCD usando como fase móvel 100% de diclorometano.

Síntese do composto m-nitrofenilamina

Foi preparada uma solução de 945 mg (6,75 mmol) de hexamina em 6 mL de clorofórmio, e então vertida sobre uma solução de 1,5 g (6,15 mmol) de α -bromo-*m*-nitroacetofenona em 7 mL de clorofórmio. À mistura resultante adicionou-se 4 mL de clorofórmio para auxiliar na agitação. A reação foi mantida sob agitação por 24 horas, e então resfriada em banho de gelo e filtrada. O sólido foi lavado com 15 mL de clorofórmio e 10 mL de etanol absoluto e então seco em dessecador sob pentóxido de fósforo, obtendo-se o sal de hexametilenoctetramina.

Preparou-se uma solução de 17,5 mL de etanol 95% e 8,5 mL de HCl concentrado. 2,3 g do sal de hexametilenoctetramina obtido anteriormente foi adicionado com vigorosa agitação em 8 mL da mistura ácida preparada conforme descrito. O sal dissolveu-se em 30 minutos e rapidamente começou a precipitar. A reação permaneceu por 3 dias sob agitação a temperatura ambiente. Após resfriamento com gelo, o sólido foi filtrado e recristalizado com 3 mL de água, e lavado com etanol absoluto. Os cristais de cloridrato de *m*-nitrofenilamina foram secos sob vácuo.

Síntese do composto 2-amino-1-(3-nitrofenil)etan-1-ona tiossemicarbazona

Em balão de 50 mL, foi adicionado 0,5 g (2,3 mmol) do composto cloridrato de *m*-nitrofenacilamina, 0,76 g (2,3 mmol) de tiossemicarbazida, 0,47 mL de ácido acético glacial e 10 mL de etanol. A reação permaneceu sob agitação por 48 horas sob refluxo. O precipitado formado foi filtrado a quente.

A reação foi acompanhada por HPLC (coluna shim-pack ODS C-18, fase móvel mistura de 20 % água, 30% acetonitrila e 50% tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,5 e fluxo de 1 mL por minuto) e o produto apresentou como faixa de fusão 213 a 214 °C e obteve-se 0,84 g (30% de rendimento).

A1.7. Síntese do composto acetofenona tiossemicarbazona (TS-7)

Em um balão de 150 mL foi adicionado 0,97 mL (8,32 mmol) de acetofenona, 0,76 g (8,32 mmol) de tiossemicarbazida, 1,7 mL de ácido acético glacial e 15 mL de etanol absoluto. A reação permaneceu sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente.

A mistura reacional foi mantida em geladeira por 24 horas, e por filtração foram obtidos 1,29 g (80% de rendimento) do composto desejado.

A reação foi acompanhada por CCD utilizando como fase móvel 20% de acetato de etila em diclorometano e o produto apresentou como faixa de fusão 120 a 121 °C.

A1.8. Síntese do composto 3-nitroacetofenona tiossemicarbazona (TS-8)

Em um balão de 150 mL foram adicionados 1 g (6,06 mmol) de 3-nitroacetofenona, 0,55 g (6,06 mmol) de tiossemicarbazida, 1,25 mL de ácido acético glacial e 15 mL de etanol. A reação foi mantida sob agitação por 24

horas a temperatura ambiente e então resfriada e mantida em geladeira por mais 24 horas, sendo o precipitado removido por filtração. A reação foi acompanhada por CCD utilizando como fase móvel 20% de acetato de etila em diclorometano e o produto apresentou como faixa de fusão 224 a 226 °C e obteve-se 1,16 g (81% de rendimento).

A1.9. Síntese do composto hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS-9)

Obtenção do composto 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona

Foi preparada uma solução de 945 mg (6,75 mmol) de hexamina em 6 mL de clorofórmio, e então vertida sobre uma solução de 1,5 g (6,15 mmol) de α -bromo-4-nitroacetofenona em 7 mL de clorofórmio. À mistura resultante adicionou-se 4 mL de clorofórmio para auxiliar na agitação. A reação foi mantida sob agitação por 24 horas, e então resfriada em banho de gelo e filtrada. O sólido foi lavado com 15 mL de clorofórmio e 10 mL de etanol absoluto e então seco em dessecador sob pentóxido de fósforo, obtendo-se o sal de hexametilenotetramina.

Preparou-se uma solução de 17,5 mL de etanol 95% e 8,5 mL de HCl concentrado. 2,3 g do sal de hexametilenotetramina obtido anteriormente foi adicionado com vigorosa agitação em 8 mL da mistura ácida preparada conforme descrito. O sal dissolve-se em 30 minutos e rapidamente começou a precipitar. A reação permaneceu por 2 dias sob agitação a temperatura ambiente. Após resfriamento com gelo, o sólido foi filtrado e recristalizado com 3 mL de água, e lavado com etanol absoluto. Os cristais de cloridrato de *p*-nitrofenacilamina foram secos sob vácuo.

Obtenção do composto 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (TS-9)

Em um balão de 250 mL de fundo redondo, solubilizou-se sob aquecimento 841 mg (9,23 mmol) de tiossemicarbazida previamente triturada em 50 mL de etanol.

2 g (9,23 mmol) da α -amina-4-nitroacetofenona foram solubilizados a temperatura ambiente em uma solução contendo 90 mL de etanol e cerca de 2 mL de ácido acético glacial, empregando-se um béquer de 250 mL. A solução adquire coloração laranja clara.

A solução de α -amina-4-nitroacetofenona foi adicionada lentamente com o auxílio de funil de adição sobre a solução aquecida de tiossemicarbazida. Após o final da adição, um excesso de 1g de tiossemicarbazida foi adicionado à solução resultante. O aquecimento foi mantido até completa solubilização da massa adicionada e então foi desligado, permitindo que a reação permanecesse por 48 h, protegida da luz e com contínua agitação a temperatura ambiente.

Ao término deste período, a reação foi filtrada para eliminar o excesso de tiossemicarbazida não reagida e o solvente foi removido por evaporação a pressão reduzida, sendo o resíduo obtido solubilizado em cerca de 20 mL de água destilada a quente e permitido precipitar por até 15 dias a temperatura ambiente e protegido da luz solar.

Nos primeiros 3 dias de recristalização, obteve-se um produto de coloração escura (aproximadamente 1g), o qual foi removido por filtração e intitulado “isômero 1”, nos dias subsequentes de recristalização obteve-se preferencialmente o “isômero 2”, de coloração amarelo clara, o que pode ser observado por HPLC (coluna shim-pack ODS C-18, fase móvel mistura de 20 % água, 30% acetonitrila e 50% tampão acetato de sódio 25 mM pH 4,5 e fluxo de 1 mL por minuto). O produto foi filtrado e lavado com água gelada e mantido em dessecador sob pentóxido de fósforo por 24h até completa secura. Os isômeros apresentaram uma mesma faixa de fusão 170 a 173 °C e obteve-se 0,93 g (30% de rendimento).

Obtenção do composto hemissuccinato de 2-amino-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS-9)

Em balão de 125 mL, foi adicionado 0,5 g (1,50 mmol) do composto bromidrato de 2-amino-4-nitroacetofenona tiossemicarbazona, 0,150 g (1,50 mmol) de anidrido succínico e 25 mg de DMAP em 70 mL de acetonitrila previamente seca e destilada. A reação foi mantida por 48 horas a temperatura ambiente, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo recristalizado em água destilada. O produto obtido foi analisado por CLAE e RMN ^1H , ^{13}C e HMBC e apresentou como faixa de fusão 187 a 190 °C e obteve-se 0,24 g (45% de rendimento).

A1.10. Síntese do composto hemissuccinato de 2-hidroxi-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS-10)

Obtenção do composto 2-hidroxi-1-(4-nitro)acetofenona

Uma solução de 5g (20,6 mmol) de 2-bromo-1-(4-nitro)acetofenona e 5 g (30 mmol) de AgNO_3 em 250 mL de água e 150 mL de acetona foi refluxada por 4 horas com agitação constante. Após o resfriamento, filtrou-se o material insolúvel da solução e o filtrado foi extraído duas vezes com porções de 150 mL de diclorometano. O resíduo sólido obtido após evaporação do solvente a pressão reduzida foi recristalizado em etanol (50%) a quente rendendo 2 g do produto puro (54% de rendimento).

Obtenção do composto 2-hidroxi-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (TS-10)

Uma solução contendo 10 mL de etanol, 0,5 mL de ácido acético glacial e 0,5 g (2,76 mmol) do composto 2-hidroxi-1-(p-nitro)acetofenona foi vertida a quente e gota-a-gota sobre uma solução de 0,277 g de tiossemicarbazida (3,04 mmol) em 10 mL de etanol. A reação foi mantida sob refluxo por 24 horas, e o produto formado removido por filtração ainda a quente e recristalizado em etanol rendendo 0,57 g (81% de rendimento) do composto 2- hidroxi -1-(4-

nitro)acetofenona tiossemicarbazona e o produto apresentou como faixa de fusão 211 a 212 °C, com decomposição.

Obtenção do composto hemissuccinato de 2-hidroxi-1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona (MTS-10)

Em balão de 125 mL, foi adicionado 0,5 g (2 mmol) do composto 2-hidroxi -1-(4-nitro)acetofenona tiossemicarbazona, 0,200 g (2 mmol) de anidrido succínico e 25 mg de DMAP em 70 mL de acetonitrila previamente seca e destilada. A reação foi mantida por 48 horas a temperatura ambiente, o solvente foi evaporado a pressão reduzida e o resíduo recristalizado em água destilada. O produto obtido foi analisado por CLAE e RMN ¹H e apresentou como faixa de fusão 179 a 180 °C e obteve-se 0,31 g (45% de rendimento).

A2. Teste *In Vitro* de Atividade Tripanocida

Preparo do inóculo

A cultura cepa Y de *T. cruzi* foi mantida em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), cuja composição era: NaCl 68,4 mM KCl 5,4 mM; Na₂HPO₄ 56,3 mM; dextrose 111 mM e infusão de fígado *Broth* 0,3%, *Tryptose* 0,5% e *Haemin* 25 mg/L. O volume foi completado com água para 900 mL e incubado a 68 °C por 1 hora. Ajustou-se o pH para 7,2, filtrou-se em membrana de 0,22 µm e o meio foi então enriquecido com 10% de soro fetal bovino estéril (v/v);

O preparo deste meio de cultura, bem como os ensaios foram realizados no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, sob coordenação da Profa. Dra. Regina Cicarelli e colaboração da mestre Gabriela Duó Passerini.

Preparo da solução dos compostos a serem testados

Foi realizada a solubilização dos compostos em DMSO, e diluídos com o mesmo solvente para concentrações finais de 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 e 1 µg/mL, os ensaios foram realizados em triplicata.

Preparo do ensaio

O ensaio foi realizado em placa de Elisa de 96 poços de modo que em cada placa foram ensaiadas duas substâncias, conforme figura A.1.

	substância 1						substância 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Concentrações empregadas por linha:

A = 100 µg/mL

B = 50 µg/mL

C = 25 µg/mL

D = 10 µg/mL

E = 5 µg/mL

F = 2,5 µg/mL

G = 1,0 µg/mL

H = controle sem substância

Legenda:

 Substância e parasita (10^7 parasitas por mL)

 Substância e meio de cultura (branco)

Figura A.1: Representação da placa de Elisa de 96 poços empregada para o ensaio de atividade tripanocida

3 µL de cada solução diluída dos compostos foram adicionados a 97 µL de meio LIT contendo as formas epimastigotas de *T. cruzi* (10^7 parasitas por mL) e a placa foi então incubada em câmara úmida a 28 °C por 72 horas. Adicionou-se em seguida 10 µL de solução MTT/PMS em cada um dos poços, e incubou-se novamente a placa ao abrigo da luz por mais 75 minutos a 28 °C, quando ocorre a redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] em um produto colorido, formazan, através da ação da enzima succinato desidrogenase das mitocôndrias. O PMS (metanossulfonato de fenazina) foi empregado como carregador intermediário de elétrons para intensificar a reação de redução durante a incubação, e conseqüentemente, o

desenvolvimento de coloração (DUTTA, BANDYOPADHYAY, MANDAL, et al., 2005).

A leitura da densidade ótica foi realizada em espectrofotômetro (Leitor de Elisa) a 595 nm. A concentração do produto colorido formado foi proporcional à atividade tripanocida (DUTTA, BANDYOPADHYAY, MANDAL, et al., 2005).

O IC₅₀ (concentração capaz de matar 50% dos parasitas) foi calculado a partir da regressão linear dos valores obtidos espectrofotometricamente.

A3. Ensaio de Mutagenicidade - Teste do Micronúcleo

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara, sendo toda a metodologia de experimentação com animais aprovada (Protocolo CEP/FCF/CAr. Nº 38/2008).

Para a avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos compostos TS-9, MTS-9, TS-10 (os compostos mais ativos) e benznidazol (BZD) foi empregado o teste de Micronúcleo em células do sangue periférico de camungongos Swiss albinos, com aproximadamente 30 g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – Unesp. Os animais foram mantidos em gaiolas durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23± 2 °C.

Para receber os tratamentos, grupos de 10, sendo 5 machos e 5 fêmeas, foram separados para cada dosagem administrada. Cada um deles recebeu as diferentes doses dos compostos via gavagem.

Grupo I: Controle Negativo – Solução de carboximetilcelulose (CMC) 1% e Tween 40 0,2% (1 mL/100g p.c.)

Grupo II: Controle Positivo – Ciclofosfamida (50 mg/kg)

Grupo III: TS9 – 50 mg/kg

Grupo IV: TS9 – 100 mg/kg

Grupo V: TS9 – 250 mg/kg

Grupo VI: MTS9 – 50 mg/kg

Grupo VII: MTS9 – 100 mg/kg

- Grupo VIII: MTS9 – 250 mg/kg
Grupo IX: TS10 – 50 mg/kg
Grupo X: TS10 – 100 mg/kg
Grupo XI: TS10 – 250 mg/kg
Grupo XII: BZD – 100 mg/kg

O protocolo adotado para a realização deste trabalho foi o descrito por Hayashi *et al.*, no qual se empregam lâminas pré-coradas por Laranja de Acridina (acridine orange) (HAYASHI; MORITA; KODAMA; et al., 1990).

Preparo das lâminas com laranja de acridina

As lâminas (previamente limpas com etanol) foram aquecidas em uma placa aquecedora a aproximadamente 70°C. Uma vez aquecidas, colocou-se 10 µL de solução de laranja de acridina (1 mg/ml) sobre a lâmina e fez-se o espalhamento utilizando a extremidade de outra lâmina bem limpa. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, a temperatura ambiente, em local escuro, por pelo menos 24h.

Obtenção do sangue e preparo das células

Com o auxílio de uma agulha, perfurou-se cauda do animal, coletando-se 5 µL de sangue (uma gota) e depositando-a no centro da lâmina previamente preparada com laranja de acridina, cobrindo-a com uma lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas a –20°C e no escuro por no mínimo 24 horas antes da análise citológica, propiciando uma melhor ação do corante.

A análise citológica das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, para evitar a deterioração do material. Esta análise deve ser realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram contados 1000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de células micronucleadas.

ANEXO B

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS PARA A OBTENÇÃO DE NANOANTICORPOS ANTI-TRANSIALIDASE E ANTI-J-18

B1. Extração dos linfócitos

Amostra de 50 mL do sangue fresco imunizado coletado de dromedário, contendo anticoagulante, foi diluída com 1 volume de NaCl 0,9%. Em tubos tipo Falcon de 50 mL vazios, adicionou-se 10 mL de lymphoprep (Nycomed) utilizado para separar células mononucleadas como linfócitos de células polimorfonucleadas pelo aumento da taxa de sedimentação destes, e então 20 mL da mistura sangue/NaCl foram adicionados nestes tubos contendo a primeira solução.

Os tubos foram centrifugados por 90 minutos a 671 x g e os linfócitos foram então coletados. Para romper as células dos linfócitos, estas foram aspiradas e expelidas com uma seringa através de agulha 19 G (5 a 6 vezes) e depois de 23 G (5 a 6 vezes).

Adicionou-se 4 mL do tampão A, no qual adicionou-se 1% de mercapto etanol antes do uso, e 400 µL de tampão acetato de sódio 2 M pH = 4,0, 4 mL de fenol saturado com água e 2 mL de mistura 24:1 de clorofórmio e álcool isoamílico. Após homogeneização, incubou-se por 10 minutos no gelo.

Centrifugou-se por 10 min a 17530 x g e 4 °C. A fase superior foi transferida para um novo frasco e novamente adicionou-se fenol saturado com água e mais 2 mL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico.

Após misturar, incubou-se por 10 minutos no gelo, centrifugou-se por mais 10 minutos a 2683 x g e 4 °C. Transferiu-se a fase superior para um novo frasco e adicionou-se 3 mL de etanol gelado. A mistura resultante foi fracionada em 7 tubos eppendorf, e armazenada por ao menos 30 minutos a -80 °C.

Centrifugou-se por 10 minutos a 17530 x g, descartou-se o sobrenadante e secou-se o resíduo (pellet), os quais foram todos dissolvidos em 300 µL de água livre de RNase. O total de RNA foi então quantificado por UV (260 nm).

B2. Preparação do cDNA

Para este procedimento, assim como no anterior, toda água empregada era livre de RNase por tratamento com DEPC (dietilpirocarbonato).

Para aproximadamente 50 µg do RNA total, 2,5 µg de primer Oligo (DT) e 105,5 µL de água de DEPC foram adicionados. Distribuiu-se essa mistura em 5 tubos de 0,5 mL (23 µL por tubo). Incubou-se esta mistura por 10 minutos a 70 °C e depois por 5 minutos no gelo.

Foi preparada uma mistura suficiente para 5,5 tubos contendo: 44 µL de tampão (5X Superscript II RNase H⁻ kit transcriptase reversa), 22 µL de ditionitroto DTT 0,1 M, 11 µL de dNTPs (10 mM cada), 5,5 µL de HPRI (inibidor de RNase placentária humana, 40 U/ µL) e 11 µL de transcriptase (200 u/ µL). Foi adicionado desta mistura 17 µL a cada frasco contendo 23 µL da mistura anterior. Após isso foi realizado uma amplificação por PCR.

B3. Construção da biblioteca de VHH no vetor pHEN4

Amostras de 0,5 µL, 1 µL e 3 µL de cDNA foram retiradas para se verificar a melhor condição de amplificação. Adicionou-se a cada amostra os primers CALL001 e CALL002 (1 µL de 20 µM de uma solução estoque), 1,25 U de Taq polimerase (5U/ µL), 5 µL de tampão 10X, 1 µL de dNTPs 20mM (5mM de cada dNTP) e completou-se o volume para 50 µL com água e realizou-se amplificação por PCR. Após a realização do PCR foi aplicado 10 µL da amostra em gel de agarose 1% com brometo de etídeo e a eletroforese foi realizada em meio TBE. A condição escolhida para maior produção foi a que rendeu maior quantidade de material entre 650 a 750 bases de pares verificado pela eletroforese, no caso foi a que utilizou 3µL de cDNA. Foi então realizado um PCR em 10 tubos (50 µL, na condição escolhida).

Desta amplificação, correu-se o produto em gel de agarose a 1% com brometo de etídeo em TBE e eliminou-se a banda de 900 pares de base que continha fragmentos de VH-CH1-CH2' e separou-se banda de 650 a 750 pares

de bases, que contém os genes VHH, que foram purificados da agarose utilizando kit de extração em gel (Qiaquick PCR).

Os DNAs do VHHs purificados foram reamplificados por PCR utilizando dez tubos com a concentração de 1,5 µL da diluição de 1/10 com os primers A6E e FR4FOR (1 µL de primer na concentração de 20 µM), 1,25 U Taq polimerase e 5 µL de tampão 10 x, 1 µL de dNTPs 20 µM e água para completar 50 µL. Desta quantidade, após purificação com kit de purificação de PCR, obteve-se aproximadamente 1,5 µg que foram digeridos durante uma noite a 37 °C com 20 U de PstI e 20 U de NotI (enzimas Roche) em tampão apropriado e então purificou-se novamente com o Kit de purificação. Enquanto isso, o vetor pHEN4 (20 µg) foi digerido com 200 U de PstI e 200 U de NotI a 37 °C ,durante a noite toda, e purificado com o kit Qiaquick.

A partir dos fragmentos digeridos de VHHs e do vetor pHEN4, realizou-se a ligação a partir de 3 µg de vetor (1 equivalente molar) para 900 ng dos fragmentos (3 equivalentes molares), utilizando 3 µL da enzima T4 ligase (5U/µL) e 10% do volume total de tampão 10x ligation. A reação de ligação foi deixada a noite inteira a 16 °C e após este período, a enzima T4 ligase foi inativada por aquecimento de 10 min a 65 °C.

Para maior recuperação do DNA, a reação foi extraída 2 vezes com 1 volume de fenol saturado com água e então foi misturada com auxílio de vórtex e centrifugada por 10 minutos a 15115 x g. A fase superior foi transferida para um tubo novo e a ela foi adicionado clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), misturado com vórtex e centrifugado por 10 minutos a 15115 x g. A fase superior foi transferida para um novo tubo e a fase inferior foi novamente extraída com a mistura de clorofórmio e álcool isoamílico. A fase superior desta nova extração foi misturada à primeira fração de fase superior coletada. O DNA contido nas fases superiores foi precipitado pela adição de 1/10 de volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol gelado. Misturou-se tudo e manteve-se essa mistura a -80 °C por pelo menos 30 minutos. Centrifugou-se por 20 minutos a 15115 x g, descartou-se o sobrenadante e secou-se o precipitado, o qual após seco foi dissolvido em 150 µL de água.

Sobre a solução resultante, adicionou-se 1500 µL de células *E. coli* TG1 eletrocompetentes, mexeu-se gentilmente e incubou-se no gelo por 1 minuto.

Alíquotas de 55 µL foram retiradas para transformação através de choque elétrico (1.8 kV/cm), realizada em cubetas de 1 mm de eletroporação. Após aplicado o choque, cada pequena alíquota foi imediatamente colocada em 500 µL de um meio rico denominado SOC para recuperação destas células que agora contém o vetor ligado ao VHH. Todas as alíquotas foram colocadas em um mesmo frasco e incubadas a 37 °C por 1 hora para que as células crescessem. A partir deste frasco, foram feitas diluições 1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000 e semeados 100 µL de cada diluição em placa de petri com meio LB-ágar (glicose 2% e ampicilina) em duplicata para verificação do tamanho da biblioteca, neste caso foi de 3,6 X 10⁸ células/mL, e o restante foi semeado em 6 placas grandes (24,5 cm x 24,5 cm) com meio LB-ágar (glicose 2% e ampicilina) e deixadas a 37 °C por 24 horas. Nas placas grandes após 24 h, foram retiradas as colônias pela adição de 2 mL de meio LB e raspagem das mesmas. A suspensão de colônias foi colocada em um mesmo tubo Falcon de 50 mL com volume total aproximado de 20 mL bem misturado com auxílio de vórtex, a este volume foi adicionado 5 mL de glicerol 100%. A suspensão resultante foi então redistribuída para vários tubos eppendorfs contendo 800 µL cada, e mantidos a -80 °C.

B4. Seleção de nanoanticorpos específicos aos antígenos TS e J-18 (panning), realização da 1^a, 2^a e 3^a etapa de seleção

Em uma placa de Elisa de 96 poços (placa nunc maxisorp fundo chato), cobriu-se um único poço com 100 µL de solução 100 µg/mL de antígeno em meio PBS. Paralelamente, semeou-se *E. coli* TG1 em uma placa de petri redonda contendo meio LB Agar, a qual foi incubada durante a noite a 37 °C.

Posteriormente, 100 µL da biblioteca de VHH foram adicionados a 100 mL de meio 2xTY, contendo 100 µL de ampicilina 100 mg/mL e 5mL de glicose 20%. Este meio de cultura foi deixado em agitação a 200 rpm durante 3 horas para crescimento exponencial das células da biblioteca que contêm F-pillus. Após este período foi adicionado 10¹² fagos M13KO7 e o meio de cultura foi deixado por mais 30 minutos a temperatura ambiente sem agitação para que os fagos penetrassem via F-pillus. O meio de cultura contendo as células

infectadas foi fracionado em dois tubos falcon de 50 mL, e estes foram então centrifugados por 10 minutos a 671 x g, e então se removeu o sobrenadante destes. O pellet foi ressuscitado em 300 mL do meio 2xTY contendo 300 µL de ampicilina a 100 mg/mL e 300 µL de canamicina a 70 mg/mL e incubado sob agitação de 200 rpm a 37 °C durante a noite para produção de fagos contendo VHH expressos em seus capsídeos.

Inoculou-se uma colônia de *E. coli* TG1 em 15 mL de meio LB em um tubo falcon de 50 mL, este inóculo foi preparado antes para ser utilizado na infecção por fagos após panning. O inóculo foi mantido por agitação a 37 °C por aproximadamente 3 horas.

Após isso, centrifugou-se os 300 mL do meio de cultura do dia anterior infectado por fago M13KO7 durante 30 minutos a 4 °C e a 10733 x g. O resíduo foi descartado e o sobrenadante recolhido. O sobrenadante foi distribuído em 7 tubos de 50 mL contendo cada um 42 mL de sobrenadante e 8 mL de uma solução 20% de PEG 6000 em cloreto de sódio 2,5 M, para auxílio na precipitação dos fagos e vírions, formando-se duas fases. Os tubos foram misturados 5 vezes por inversão e mantidos no gelo durante 30 minutos. Os frascos foram então centrifugados a 4 °C e 2683 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado em um béquer contendo hipoclorito de sódio e o precipitado branco retido nos frascos foi seco através da inversão dos tubos em uma toalha de papel. O precipitado branco foi ressuscitado utilizando um volume total de 1mL de PBS. Esse material ressuscitado foi centrifugado por 2 minutos a 17530 x g para que precipitados residuais de bactérias pudessem ser eliminados, dando origem a 1mL suspensão de fagos contendo VHHs expressos em seus capsídeos.

A solução de antígeno previamente preparada na placa de Elisa foi removida e lavada 5 vezes com PBS. As partes internas livres do poço foram bloqueadas com 200 µL de uma suspensão de leite em pó 2%. Da mesma forma, um outro poço distante do anterior, que não recebeu a solução de antígeno, foi bloqueado com a mesma suspensão de leite em pó para servir de branco. Após o período de 1 hora as suspensões dos dois poços foram descartadas e os poços lavados 5 vezes com PBS.

O início da primeira etapa de seleção começou a partir da adição ao poço positivo (que foi adicionado antígeno) e ao negativo (sem adição de antígeno) de 100 µL da suspensão de fagos contendo VHHs, e manteve-se em contato durante 1 hora nos poços. Após este período, os poços foram lavados dez vezes nesta primeira etapa com uma solução de PBS contendo 0,05% de tween 20 (PBST).

Adicionou-se ao poço positivo e ao negativo 100 µL de uma solução de 70 µL de trietilamina em 5 mL de água, a qual permaneceu nos poços por cerca de dez minutos para dissociação dos fagos contendo VHHs que se aderiram fortemente ao antígeno. Estes fagos foram transferidos para eppendorfs distintos contendo 100 µL de uma solução de tampão Tris 1 M pH 7,4, para neutralização da solução de fagos de modo que eles não perdessem sua infectividade. Estes fagos eluídos foram utilizados para visualizar o fator de enriquecimento produzido pelos fagos que reconheceram o antígeno sobre as partículas não especificamente associadas, e também para reinfecção de *E. coli* TG1 para a segunda etapa de seleção.

Para visualização do fator de enriquecimento, duas colunas de poços, o mais distante possível uma da outra, de uma placa de Elisa de 96 poços e fundo redondo para cultivo de células, foram preenchidas com 90 µL de PBS (placa A). No primeiro poço de uma fileira foi adicionado 10 µL de fagos eluídos do poço positivo; no primeiro poço da outra coluna foi adicionado fagos eluídos do poço negativo provenientes da primeira placa de Elisa. A partir do poço em que foi adicionado os fagos eluídos, uma alíquota de 10 µL foi retirada e passada para o poço abaixo na mesma coluna e deste foi retirado 10 µL para o poço imediatamente abaixo e assim sucessivamente até a fileira G da placa de Elisa, sendo que cada transferência resultou em uma diluição de dez vezes, formando uma coluna positiva e outra negativa.

De maneira semelhante à placa A, duas fileiras distantes em outra placa de Elisa (placa B) foram preenchida com 90 µL de suspensão de *E. coli* TG1, as quais foram mantidas em crescimento por 3 horas em meio LB como mencionado anteriormente. Com auxílio de uma micropipeta multicanal, transferiu-se de uma só vez 10 µL de cada diluição da coluna positiva da placa A para a placa B (figura 2.10), o mesmo procedimento foi repetido para coluna

negativa, formando na placa B uma nova coluna positiva e outra negativa. A placa B foi então colocada na estufa a 37 °C para que os fagos pudessem infectar as células por 30 minutos.

Com auxílio da micropipeta multicanal, retirou-se de uma só vez 10 µL de cada poço da coluna positiva e semeou-se estas alíquotas em uma placa de petri quadrada, contendo meio LB Agar e 100 µg/mL de ampicilina e 1% de glicose, da esquerda para direita até o meio, formando 7 riscos correspondentes as diluições de A a G da placa B. Na outra metade da placa foram feito os 7 riscos correspondente a coluna negativa, feitos da mesma maneira como descrito para coluna positiva. A placa foi então mantida na estufa a 37 °C, durante a noite. Estando assim lado a lado na mesma placa, foi possível verificar que os 7 riscos positivos tiveram maior crescimento quando comparados com os riscos negativo.

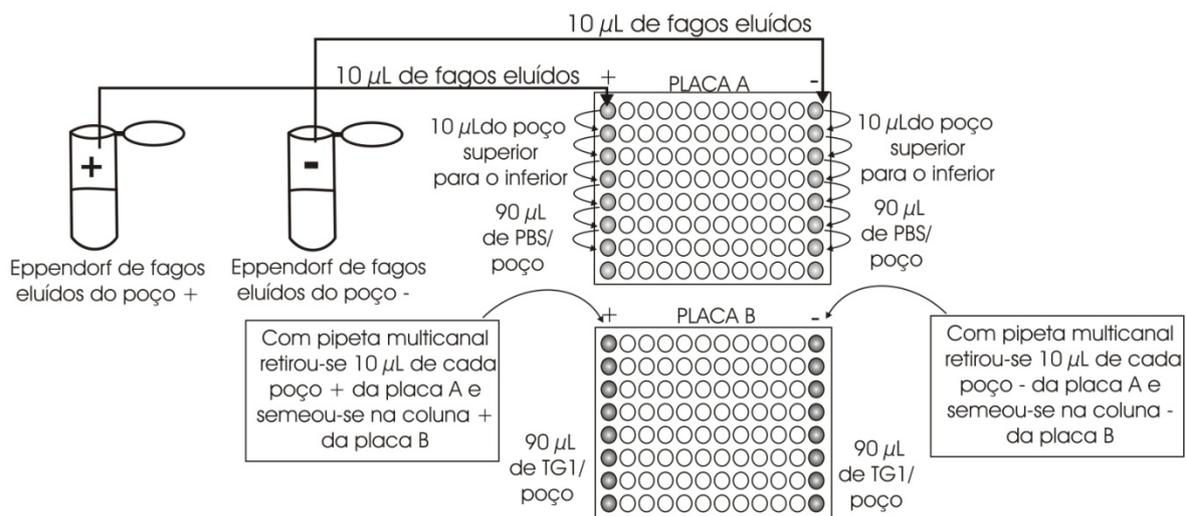


Figura 2.11: Representação da utilização das placas A e B

Os 90 µL remanescentes da placa B, tanto da coluna positiva quanto da negativa, e exceto o primeiro poço de cada, foram semeados em placas LB Agar com glicose e ampicilina, sendo empregada uma placa para cada diluição, para que as colônias formadas fossem avaliadas para verificar a seleção dos nanoanticorpos pelo antígenos J-18 e TS.

Os 190 µL restantes da suspensão de fagos contendo VHHs expressos em seus capsídeos do poço positivo, neutralizado com tampão Tris pH 7,4 conforme já descrito, foram adicionados a 2 mL de células TG1 em meio LB

também já mencionado, em um tubo falcon de 15 mL. Este tubo foi incubado a 37 °C por 30 minutos, e após este período foi adicionado 8 mL do meio 2xTY-ampicilina-glicose (100 mL de 2xTY a 100 µg/mL de ampicilina + 5 mL de glicose a 20%). O frasco foi incubado novamente a 37 °C por 30 minutos. Após este período foi adicionou-se 10⁷ fagos M13KO7 e incubou-se por 20 minutos sem agitação e a temperatura ambiente. Então o frasco foi centrifugado por 10 minutos a 671 x g, e o resíduo celular ressuspendido com 5 mL do meio 2xTY contendo ampicilina (100 µg/mL) e canamicina (70 µg/mL), e então colocado em um erlenmeyer de 1 L contendo 300 mL do mesmo meio. O frasco foi deixado sob agitação durante a noite a 200 rpm e a 37 °C para multiplicação das colônias infectadas por fago que foram eluídas do poço positivo.

Em uma nova placa de Elisa, foi adicionado 10 µg do antígeno (solução 100 µg/mL) e foi deixado em repouso durante a noite a 4 °C para uma segunda etapa de seleção.

O meio de cultura do erlenmeyer contendo as cepas TG1 infectadas pelos fagos da primeira etapa de seleção foi submetido a centrifugação por 30 minutos a 4 °C e 10733 x g, o procedimento foi realizado em conformidade com a página 142 até a obtenção de 1mL suspensão de fagos contendo VHHs expressos em seus capsídeos selecionados pela primeira etapa, a partir do qual iniciou-se a segunda etapa de seleção; o procedimento a partir deste ponto foi igual ao realizado na primeira etapa.

Ao poço positivo (onde foi adicionado antígeno) e ao negativo (sem adição de antígeno) foi adicionado 100 µL do 1mL proveniente de suspensão de fagos contendo o VHH do término da primeira etapa de seleção. A única diferença foi que nesta segunda etapa os poços foram lavados 20 vezes com a solução de PBS contendo 0,05% de tween 20. Ao final da segunda etapa um novo meio de cultura contendo as células TG1 infectadas pelos fagos da segunda etapa foi incubado durante a noite, centrifugado no dia posterior, e recolhido o sobrenadante deste, que após procedimento igual ao realizado na primeira etapa, deu origem a 1 mL de suspensão de fago contendo os VHHs selecionados pela segunda etapa para que uma terceira etapa de seleção fosse realizada de forma igual a segunda etapa.

B5. Avaliação da 2ª e 3ª etapa de seleção de nanoanticorpos específicos pelos antígenos J-18 e TS

As 48 colônias da segunda e terceira etapa de seleção de cada antígeno, J-18 e TS, foram avaliadas a partir das colônias formadas pela semeadura nas placas LB ágar contendo ampicilina e glicose dos 90 μL remanescentes da placa B da coluna positiva. As colônias foram escolhidas e numeradas e com auxílio de ponteiros estéreis em oito placas de Elisa de cultivo de células de 24 poços de fundo chato. Essas placas continham em cada poço 1 mL do meio TB com ampicilina na concentração de $1\mu\text{g/mL}$ e foram incubadas a $37\text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 200 rpm, o crescimento das células foi checado visualmente, sendo que o tempo de crescimento adequado foi cerca de 5 horas. Após este período adicionou-se a cada poço 10 μL de isopropil- β -D-tiogalatospiranosídeo (IPTG) 1M e então incubada em estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$ com agitação de 200 rpm durante a noite.

Duas placas de Elisa de 96 poços nunc maxisorp fundo chato, uma placa para cada antígeno J-18 e TS, foram cobertas com 100 μL de uma solução de antígeno $1\mu\text{g/mL}$, uma fileira sim e outra não, e então encobertas com filme de parafina (parafilm) e mantidas a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante a noite.

No dia seguinte as placas de Elisa de 24 poços foram centrifugadas por 15 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$ e 2054 x g para que as células se depositassem no fundo. Enquanto isso, as duas placas de Elisa de 96 poços foram lavadas por 3 vezes com PBST e bloqueadas com 200 μL de uma suspensão de leite a 2% em cada poço por pelo menos 1 hora. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as placas foram invertidas sobre toalhas de papel para eliminar o sobrenadante.

As células precipitadas no fundo de cada poço foram dissolvidas com 200 μL de TES (Tris, EDTA e sucrose) e colocadas sob agitação a 200 rpm e $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 30 minutos. Depois foi adicionado em cada poço 300 μL de TES/4 por cima do TES e agitou-se a 200 rpm a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 hora. Após esse período as placas foram centrifugadas a 2054 x g por 15 minutos a $4\text{ }^\circ\text{C}$, sendo que o sobrenadante, o extrato periplasmático, continha além de outras proteínas os

VHHs, pois eles eram precedidos de um sinal peptídico PelB no vetor pHEN4 para transporte para o espaço periplasmático.

Lavou-se as placas de Elisa de 96 poços 3 vezes com PBST e colocou-se em uma 100 µL do extrato periplasmático obtido a partir do antígeno J-18, e na outra, o extrato periplasmático obtido a partir da TS nas fileiras cobertas ou não com seus respectivos antígenos. As duas placas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, depois deste período elas foram lavadas por 5 vezes com PBST.

Adicionou-se a estas duas placas, nas fileiras com ou sem antígeno, 100 µL por poço de anticorpo monoclonal de camundongo anti-HA-tag na diluição de 1/1000 em PBS. Essas placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora e então a solução foi removida através de 5 lavagens com PBST.

Após as lavagens, adicionou-se nestas placas 100 µL por poço, na diluição de 1/1000 em PBS, um anticorpo contra camundongo, conjugado a enzima fosfatase alcalina. Esta solução foi deixada nos poços por 1 hora a temperatura ambiente e então foi retirada através de 5 lavagens por PBST.

Finalmente, desenvolveu-se o Elisa com o substrato da fosfatase alcalina 2 mg/mL em tampão de fosfatase alcalina e realizou-se a leitura no UV em 405 nm, revelando as colônias que produzem nanoanticorpos com maior afinidade, sempre comparada com seu branco (poço sem a presença do antígeno).

B6. Verificação por Elisa do enriquecimento das seleções da 1^a, 2^a e 3^a etapa de seleção de nanoanticorpos específicos pelos antígenos J-18 e TS

Cubriu-se 4 poços de uma mesma linha de duas placas de Elisa (96 poços), uma com 100 µL de antígeno J-18 e outra com TS na concentração de 1 µg/mL, encobriu-se com parafilm e colocou-as a 4 °C durante a noite. No dia seguinte, lavou-se por 3 vezes com PBST e bloqueou-se com 200 µL de suspensão de leite em pó a 2%, os poços da fileira que continha os antígenos e

os poços correspondentes da fileira abaixo para servirem como branco por 1 hora.

A suspensão de leite foi removida das placas e estas foram lavadas 3 vezes com PBST. Adicionou-se a ambos os poços, cobertos ou não, 90 µL de suspensão de leite em pó a 2% e no 1° poço e no imediatamente abaixo não coberto pelo antígeno, 10 µL da biblioteca com fagos anterior a primeira etapa de seleção, no 2° poço e no imediatamente abaixo, 10 µL da primeira etapa de seleção do antígeno, no 3° poço e no imediatamente abaixo, 10 µL da segunda etapa de seleção do antígeno e no 4° poço e no imediatamente abaixo, 10 µL da terceira etapa de seleção do antígeno nas duas placas que continham os antígenos J-18 e TS. Foi permitido que os fagos permanecessem por uma hora e só após este período foram removidos e lavados 5 vezes com PBST. Adicionou-se aos poços cobertos ou seus respectivos brancos 100 µL/poço de um anticorpo de camundongo contra M13 conjugado a peroxidase de rabanete (HRP, Amersham) e incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente, e então lavou-se os poços 5 vezes com PBST.

A partir de uma solução de 20 mL de ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico)] com 40 µL de água oxigenada foram adicionados 10 µL nos poços cobertos e nos seus respectivos brancos, as placas foram colocadas no escuro e a cada 5 minutos foi realizada a leitura delas no UV a 405 nm, mostrando o enriquecimento de cada etapa de seleção.

B7. Inserção dos genes do VHH no vetor pBAD/gIII

Os fagomídeos enriquecidos foram extraídos do vetor pHEN4. Primeiramente, centrifugou-se a 17530 x g em tubo eppendorf 1,5 mL de cultura em meio LB ampicilina (100 µg/mL), deixado crescer a 37 °C durante a noite e desprezou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o precipitado bacteriano em 100 µL de solução S1, adicionou-se 200 µL de solução S2 e misturou-se invertendo para cima e para baixo os eppendorfs e então se adicionou a esses tubos 150 µL da solução S3, inverteu-se os tubos para cima e para baixo para homogenizar. Incubou-se os tubos no gelo por 15 minutos e

centrifugou-se a 17530 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram retirados destes tubos e colocados em tubos novos e a esses tubos novos foram adicionados 500 µL de isopropanol, agitou-se utilizando o vórtex e esses tubos foram deixados por 15 minutos no gelo. Após este período realizou-se a centrifugação por 10 minutos a 17530 x g e desprezou-se os sobrenadantes. Adicionou-se ao precipitado, 500 µL de etanol 70% e agitou-se com auxílio do vórtex e centrifugou-se por 5 minutos e desprezou-se os sobrenadantes, secou-se os precipitados a 65 °C e acrescentou 50 µL de solução de RNase 50 µg/mL.

Foi realizado PCR de 24 fagomídeos utilizando a seguinte pré-mistura:

{	Mix (25)	187,5 µL de tampão de PCR 10 vezes concentrado		
	10µL por amostra	25 µL de dNTPs a 20 mM	96 °C 3'	
		12,5 µL de Taq polimerase (5u/ µL)	96 °C 1'	}
		950 µL de água	60 °C 1'	
		25 µL de Fwd pBAD NcoI (20 µM)	72 °C 1'	
	25 µL de Rev pBAD Sall (20 µM)	72 °C 5'	35 vezes	

Realizou-se a precipitação dos insertos de DNA, utilizando 500 µL de NaCl 0,2M e 500 µL de isopropanol por eppendorf, deixou-se por 15 minutos no gelo, centrifugou-se por 10 minutos a 17530 x g, desprezou-se os sobrenadantes e acrescentou-se a esses tubos 500 µL de etanol 70%, centrifugou-se a 17530 x g por 5 minutos, desprezou-se os sobrenadantes e secou os tubos a 65 °C e acrescentou a cada tubo 10 µL de água.

B8. Digestão dos VHH e vetor pBAD/gIII e reação de ligação

Para digestão dos fragmentos foi preparado a seguinte pré-mistura:

Mix (25)	$\left\{ \begin{array}{l} 5 \mu\text{L de NcoI} (1\text{u} = 1\mu\text{g} = 0,1 \mu\text{L}) \\ 10 \mu\text{L de Sall} (1\text{u} = 1\mu\text{g} = 0,1 \mu\text{L}) \\ \text{Tampão 10 vezes concentrado tango } 50 \mu\text{L} \\ 185 \mu\text{L de água} \end{array} \right.$
10 μL por	
amostra	

Os fragmentos foram digeridos a 37 °C por 2 horas e após este período realizou-se a precipitação dos insertos de DNA conforme ao item B7

1 μg de vetor pBAD/gIII contidos em 400 μL de água foram digeridos com 0,4 μL de NcoI, 0,8 μL de Sall e 100 μL de tampão 10 vezes concentrado tango a 37 °C por 2 horas. Após este período, essa solução foi aquecida por 20 minutos a 65 °C para inativação das enzimas.

A reação de ligação foi realizada na proporção molar de 1 equivalente molar de vetor pHEN4 para 3 equivalentes molares do inserto de VHH, utilizando 1 μL da enzima T4 ligase (5U/ μL) e 10% do volume total de tampão 10x ligation. A reação de ligação foi deixada a noite inteira a 16 °C e após este período, a enzima T4 ligase foi inativada por aquecimento de 10 min a 65 °C.

B9. Transformação em LMG194 e expressão de VHH

A transformação ocorreu na *E. coli* LMG194, a partir de 200 μL desta e 2 μL de cada plasmídeo contendo o VHH. Foi realizado o choque térmico a 42 °C por 1 minuto para que os plasmídeos fossem inseridos nas bactérias e após isto suspensão foi colocada em meio LB (2 mL) para recuperação das bactérias por 1 hora a 37 °C. 200 μL destes 2mL foram semeados em placa LB-ágar com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e deixados crescer durante a noite a 37 °C.

Quatro colônias de um mesmo clone provenientes de uma placa de LB-ágar semeada e crescida foram colocadas em quatro tubos falcon de 15 mL contendo 2 mL do meio RM com uma concentração de 2% de L-arabinose

durante a noite a 37 °C , sendo os clones induzidos, enquanto que as mesmas colônias foram crescidas nas mesmas condições, sem L-arabinose, sendo os clones não induzidos.

Após 20 horas, retirou-se 100 µL de cada tubo falcon de 15 mL e colocou-os em eppendorfs, centrifugou-se a 17530 x g por 20 segundos, desprezou-se os sobrenadantes. A cada precipitado bacteriano foi acrescentado 50 µL de loading buffer 1X, agitou-se vigorosamente para desfazer o precipitado bacteriano e deixou-os por 5 minutos a 90 °C no banho-maria. Após isto 30 µL de cada amostra foram aplicadas em gel de poliacrilamida 15%. Corou-se o gel com coomassie, descorou-o com solução descolorante e observou-se a expressão dos VHHs nos clones induzidos abaixo do marcador de 20 kDa.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)