

# Aplicação de metodologias do CADD a inibidores da 14 $\alpha$ -esterol desmetilase: triagem virtual e busca por novos candidatos a fármacos antichagásicos

Vinícius de Medeiros Alves<sup>1</sup>, Rodolpho de Campos Braga<sup>2</sup>, Carolina Horta Andrade<sup>3</sup>

<sup>1</sup>viniciusm.alves@gmail.com, <sup>2</sup>rcbraga@gmail.com, <sup>3</sup>carolandrade@gmail.com

Laboratório de Modelagem Molecular – LabMol, Faculdade de Farmácia

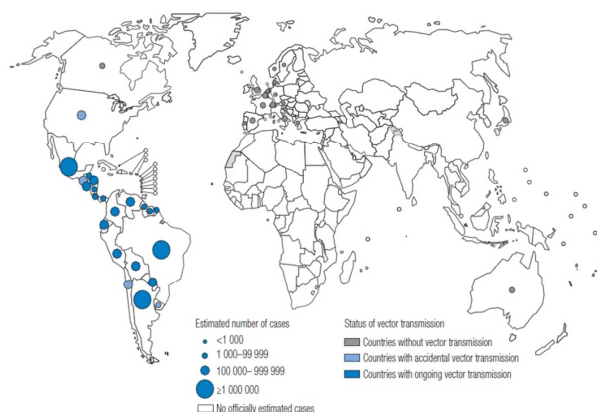
Palavras-chave: doença de Chagas, modelo farmacofórico, triagem virtual

## 1. INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são consequências marcantes do subdesenvolvimento que atinge regiões geográficas importantes do planeta, causando sensíveis prejuízos em três componentes vitais: saúde física, mental e social (BEYERER et al., 2007).

Cerca um sexto da população mundial, aproximadamente um bilhão de pessoas, é afetada com alguma DTN, entre elas as doenças causadas por protozoários (doença de chagas, leishmaniose, doença do sono, malária), helmintos (filariose, ascariíase, oncocercose, esquistossomose) bactérias (tuberculose, lepra, tracoma, úlcera de Buruli) e vírus (dengue, febre amarela, raiva) (WHO, 2010).

Dentre essas doenças, destaca-se a doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, que afeta cerca de 18 milhões de indivíduos em 18 países da América Latina (Figura 1), causando 21.000 mortes a cada ano. Além disso, mais de 100 milhões de pessoas encontram-se em áreas sob o risco de contrair a doença (MONCAYO, YANINE, 2006).

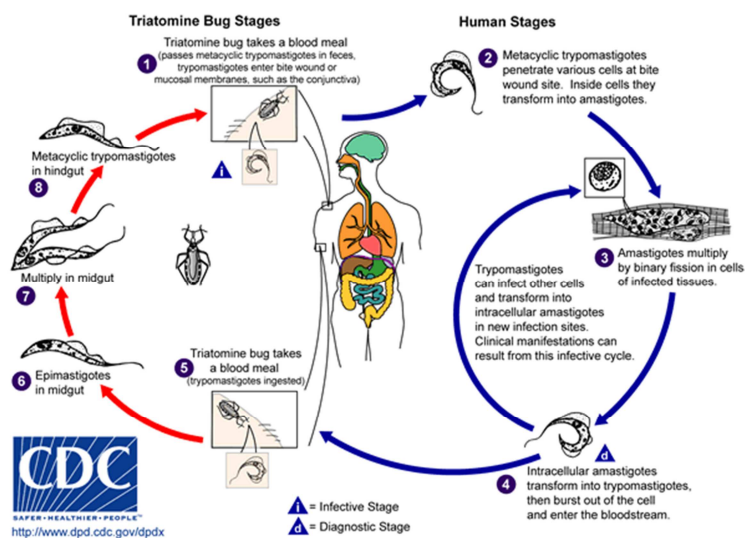


**Figura 1.** Distribuição dos casos de infecção por *Trypanosoma cruzi* baseado em dados oficiais em todo mundo entre 2006 e 2009 (WHO, 2010).

A doença de Chagas é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, o qual é principalmente transmitido pelas fezes de triatomíneos hematófagos conhecidos

vulgarmente como “barbeiros” - da ordem *Hemiptera*; família *Reduviidae* – que habitam as frestas das paredes de barro ou de madeira das chamadas cafuas (WHO/TDR, 2008). O *T. cruzi* presente nas fezes do “barbeiro” é capaz de infectar o indivíduo quando em contato com pele lesada e mucosa, incluindo conjuntiva e mucosa gástrica, sendo essa última responsável por surtos da doença ocasionados por alimentos contaminados (WHO, 2010; YOSHIDA, 2009).

Dentre os tripanosomatídeos, o *T. cruzi* é o que apresenta um ciclo de vida mais complexo (SOUZA, CARVALHO, BARRIAS, 2009). A via clássica de transmissão, representada na figura 2, tem início quando um triatomíneo inseto-vetor infectado libera tripomastigotas metacíclicas em suas fezes após o repasto sanguíneo, próximo à lesão de sua picada. Os tripomastigotas, ao adentrarem o organismo, invadem células próximas à lesão e se transformam em amastigotas – forma capaz de se multiplicar intensamente por divisão binária. Após a divisão, os amastigotas se transformam novamente em tripomastigotas e, após o rompimento da célula do hospedeiro, são liberados na corrente sanguínea sendo capazes de infectar novas células ou ser ingerida por triatomíneos (LANA, TAFURI, 2005).



**Figura 2.** Ciclo de vida do *T. cruzi* mostrando as várias formas do protozoário em hospedeiros invertebrados (triatomíneos) e vertebrados (mamíferos). Figura reproduzida da homepage do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*).

A complexa condição da doença de Chagas ocorre em decorrência da destruição celular provocada durante o ciclo do parasita. A fase aguda da doença pode ser sintomática ou não, dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Essa fase se inicia através das manifestações locais, quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva (sinal de Romana) ou na pele (chagoma de inoculação). As manifestações gerais são representadas por febre, edema localizado e generalizado, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia e, às vezes,

insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas (LANA, TAFURI, 2005; SOUZA, CARVALHO, BARRIAS, 2009).

Após a fase aguda, os sobreviventes podem passar por um longo período assintomático (10 a 30 anos), chamada de fase indeterminada. Posteriormente a ela, certo número de chagásicos podem desenvolver alterações no miocárdio e tubo digestivo (COURA, 2007; LANA, TAFURI, 2005). Essas alterações podem complicar, levando a alterações do ritmo cardíaco, potencialmente fatais; dilatação do coração, impedindo o bombeamento normal do sangue; tromboembolismo e dilatação do esôfago ou colón, levando a dificuldades de deglutição e do trânsito intestinal (RASSI Jr, RASSI, MARIN-NETO, 2009). A mortalidade em 10 anos varia de 9 a 85% dependendo do grau de dano cardíaco (RASSI et al., 2006).

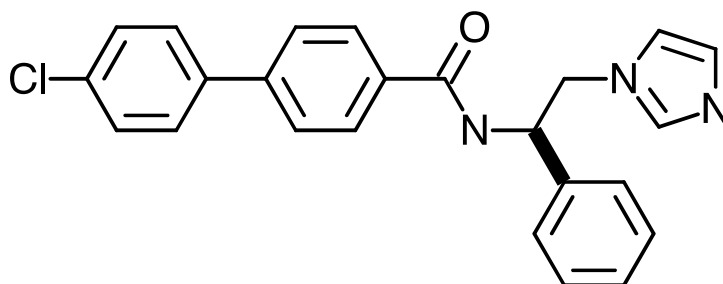
A doença de Chagas foi descrita em 1909 por Carlos Chagas, que descobriu o agente etiológico, o vetor, sua biologia no hospedeiro vertebrado e invertebrado, seus reservatórios e diversos aspectos da patogenia e sintomatologia pertinentes à fase aguda da doença (LANA, TAFURI, 2005). Após 100 anos de sua descoberta, a doença continua sendo um sério problema de saúde e econômico. A prevenção da picada e a eliminação do vetor continuam sendo as estratégias mais eficientes na tentativa de erradicação da doença, visto que ainda não existe um tratamento eficaz, sendo o mesmo mais sintomático do que etiológico (MOREL, 1999; COURA, DIAS, 2009).

O tratamento sintomático inclui fármacos que possam amenizar as diversas manifestações clínicas da doença, como diuréticos e antiarrítmicos em casos de insuficiência cardíaca congestiva e arritmias (SOARES, DOS SANTOS, 2009). Do ponto de vista etiológico, a quimioterapia contra a tripanossomíase americana é constituída por apenas dois fármacos, nifurtimox e benznidazol, disponíveis no mercado há mais de três décadas. Além da restrita eficácia, exceto na fase aguda da doença, esses fármacos apresentam elevada toxicidade e efeitos colaterais severos, além de potencial desenvolvimento de cepas resistentes do parasita (COURA, DE CASTRO, 2002). Por estas razões, é premente a necessidade de novas e mais eficazes alternativas terapêuticas.

Diante do cenário de completa ausência de inovações terapêuticas, outros fármacos têm sido avaliados no tratamento dessa parasitose. Entre eles, destacam-se os antifúngicos cetoconazol, terbinafina e posaconazol, sendo o último o que demonstra maior eficácia contra o *T. cruzi* na fase crônica. O mecanismo de ação desses compostos está relacionado à inibição da biossíntese dos esteróis constituintes da membrana plasmática do parasita (LAZARDI, URBINA, DE SOUZA, 1990; URBINA, 2009). O bloqueio da síntese

de ergosterol, principal esteroide da membrana de vários parasitas, é fatal para fungos e protozoários, visto que afeta a citocinese, impede o crescimento celular e, eventualmente, leva ao rompimento da membrana celular (LEPESHEVA et al., 2007).

Outra molécula, o 4'-cloro-N-[(1R)-2-(1H-imidazol-1-il)-1-feniletil]bifenil-4-carboxamida, denominado de VNF (Figura 3), um inibidor experimental, já demonstrou ser altamente potente contra o *T. cruzi*, apresentando baixa citotoxicidade e baixa afinidade pela 14  $\alpha$ -esterol desmetilase humana (envolvida na síntese de colesterol), o que faz dele um potencial agente tripanocida (LEPESHEVA et al., 2010).



**Figura 3.** Estrutura química do ligante bioativo VNF.

A enzima citocromo P-450 14  $\alpha$ -esterol desmetilase, também conhecida por ERG11 ou CYP51 (E.C. 1.14.13.70), constitui um alvo potencial para o planejamento de novos agentes antiparasitários, pois é especialmente envolvida na biossíntese do ergosterol (McKERROW et al., 2009; URBINA, 2009). Os antifúngicos azólicos, assim como o VNF, apresentam atividade tripanocida por inibir a atividade da CYP51 em promastigotos, epimastigotos e amastigotos, causando a diminuição dos esteróis endógenos normais (e.g. ergosterol) e acúmulo de esteróis alterados, o que torna inviável a vida do parasito (LIENDO, LAZARDI, URBINA, 1998; MOLINA et al., 2000).

O conhecimento da estrutura molecular do alvo receptor ou do complexo ligante/alvo permite o planejamento e desenvolvimento de inibidores enzimáticos ou agonistas/antagonistas de receptores, através do processo de complementaridade molecular (estéreo/eletrostática). Neste processo, planeja-se um candidato com propriedades estruturais adequadas para o reconhecimento molecular e aumento da afinidade pelo receptor biológico. Esta estratégia é conhecida como Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD, *Structure-Based Drug Design*) (KLEBE, 2006; GUIDO, OLIVA, ANDRICOPULO, 2008).

A elucidação da estrutura da enzima 14  $\alpha$ -esterol desmetilase de *T. cruzi* (CYP51<sub>TC</sub>) por métodos cristalográficos possibilita analisar os parâmetros de ligação do

inibidor, sua influência sobre a enzima do parasita e a de seres humanos, e a sua atividade em diferentes estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* pelos métodos computacionais, ou *in silico*. O conjunto desses dados pode fornecer um direcionamento para o desenvolvimento de uma nova molécula, mais potente e mais seletiva, a fim de tornar mais eficiente o tratamento da doença de Chagas (LEPESHEVA, et al., 2010).

Em contraste, a estrutura do alvo terapêutico eleito pode não ser conhecida. Neste caso, o processo de planejamento inicia-se pelo estudo das características multifuncionais dos ligantes conhecidos ou do ligante endógeno envolvido na fisiopatologia/farmacologia do processo sob investigação. Esta estratégia é conhecida como Planejamento Baseado na Estrutura do Ligante (LBDD, *Ligand-Based Drug Design*). Em muitos casos, o uso combinado das duas estratégias mencionadas, SBDD e LBDD, pode ser útil no processo de descoberta de novos fármacos, gerando informações adicionais fruto do sinergismo entre as técnicas (KUBINYI, 1993; KLEBE, 2006).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Gerar modelos farmacofóricos da enzima CYP51<sub>TC</sub>, visando o planejamento de inibidores seletivos desta enzima, que possam ser ativos contra a doença de Chagas.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Preparar um banco de dados de moléculas para ser usado na triagem virtual;
- Construção de modelos farmacofóricos da CYP51<sub>TC</sub> baseado na estrutura do receptor (SBDD);
- Construção de modelos farmacofóricos da CYP51<sub>TC</sub> baseado na estrutura dos ligantes (LBDD);
- Validação dos modelos farmacofóricos construídos
- Aplicar os modelos farmacofóricos construídos em triagem virtual

## **3. METODOLOGIA**

Todos os estudos foram realizados em estações computacionais disponíveis no Laboratório de Modelagem Molecular (LabMol) da Faculdade de Farmácia, UFG, operando em sistema operacional Linux. O LabMol possui licença própria para todos os softwares

utilizados nesse trabalho (OpenEye Scientific Software Inc., Santa Fé, New Mexico).

### 3.2 Preparo do banco de dados molecular

O banco de dados selecionado para a triagem virtual foi o da *ChemBridge database*, totalizando 449 mil moléculas *drug-like* disponíveis comercialmente. O programa FILTER foi empregado para realizar a ionização e remoção de compostos com características “*garbage filter*”, numa triagem prévia 2D. O programa OMEGA foi utilizado para gerar as estruturas tridimensionais e seus confôrmeros. Para o modelo farmacofórico baseado na estrutura do receptor (SBDD), gerou-se um modelo padrão com até 200 confôrmeros por ligante, e um modelo de alta resolução, com até 1.000 confôrmeros por ligante. Para a triagem virtual realizada com o modelo farmacofórico baseado na estrutura do ligante (LBDD), gerou-se cerca de 50 milhões de confôrmeros. As cargas foram calculadas para todas as estruturas através do método AM1-BCC no programa QUAPAC.

### 3.3 Construção de modelos farmacofóricos da CYP51<sub>TC</sub> baseados na estrutura do receptor (SBDD)

Construiu-se um modelo farmacofórico baseado no complexo ligante-receptor, utilizando-se a estrutura cristalográfica da CYP51<sub>TC</sub> complexada com o VNF e depositada no *Protein Data Bank* (PDB, código 3KSW, resolução 3,05 Å) com o programa FRED.

Para a construção desse modelo extraiu-se o ligante da proteína e fez-se um processo de *redocking*, no qual observou-se que o modelo construído foi capaz de reproduzir a posição da estrutura cristalográfica, com RMSD de 0,57 Å, demonstrando que o protocolo foi validado, podendo ser utilizado para o estudo de triagem de estruturas ainda não testadas.

O banco de dados selecionado foi filtrado utilizando-se métodos de busca de resolução padrão e de alta resolução. Para o primeiro, considerou-se até 200 confôrmeros por ligante e para o segundo, até 1000 confôrmeros. Os valores dos parâmetros rotacionais e de otimização utilizados estão nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Parâmetros de busca do *docking* realizado na triagem virtual.

	Busca exaustiva translacional	Busca exaustiva rotacional
<b>Busca de alta resolução</b>	1,0 Å	1,0 Å
<b>Busca de resolução padrão</b>	1,0 Å	1,5 Å

Tabela 2. Parâmetros de otimização do *docking* realizado na triagem virtual.

	Otimização translacional	Otimização rotacional
Busca de alta resolução	0,5 Å	0,5 Å
Busca de resolução padrão	0,5 Å	0,75 Å

### 3.4 Construção do modelo farmacofórico da CYP51TC baseado na estrutura do ligante (LBDD)

Utilizando o ROCS gerou-se um modelo farmacofórico 3D baseado na estrutura do ligante bioativo VNF. Esse modelo foi avaliado com base em um subconjunto de moléculas selecionadas como ligantes ativos e *decoys* (substâncias inativas ou substrato) da enzima CYP51<sub>TC</sub>. A triagem virtual foi realizada utilizando-se esse modelo como filtro para o conjunto de moléculas preparadas na etapa 3.2. Ao final, utilizou-se o programa EON para realizar a busca por similaridade eletrostática, considerando-se os melhores *scores* de Tanimoto Combo resultantes da busca no ROCS.

### 3.5 Análise dos dados obtidos e consenso entre os resultados

Ao final do processo de triagem virtual fez-se um consenso do resultado obtido e selecionou-se os 30 compostos com maior pontuação para aquisição comercial e futuros estudos *in vitro*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD, do inglês, *Computer-assisted drug design*) é um termo amplo que representa técnicas computacionais e recursos para o armazenamento, gestão, análise e modelagem de compostos. Tem sido de suma importância no descobrimento e desenvolvimento de fármacos nas últimas duas décadas, principalmente no que se diz respeito à identificação de novos *hits* (candidatos a fármacos) e seleção de compostos líderes (candidatos escolhidos para estudos mais aprofundados), como também na avaliação precoce da potência, seletividade e potencial desvantagens tóxicas ou farmacocinéticas (SONG, LIM, TONG, 2009).

A triagem virtual (VS, do inglês, *Virtual Screening*) é uma técnica computacional usada no descobrimento de novos candidatos a fármacos a partir de um banco de dados molecular. Seu objetivo é direcionar a busca por compostos químicos com propriedades desejadas (atividade) e eliminar compostos com propriedades indesejáveis (inativos, reativos, tóxicos, efeitos farmacocinéticos ruins) (KAPETANOVIC, 2008).

Neste trabalho optou-se por criar modelos farmacofóricos baseados na estrutura do ligante (molécula ativa) e do receptor (proteína-alvo) em via de aumentar a confiabilidade do estudo através de um consenso final realizado entre os resultados obtidos por ambos os métodos.

O alvo molecular escolhido foi a CYP51<sub>TC</sub> por ser uma proteína essencial na síntese do ergosterol, principal esteroide de membrana dos protozoários. Além disso, essa proteína possui sua estrutura cristalográfica elucidada e disponível no PDB, complexada com três inibidores diferentes: (i) fluconazol (código PDB 2WX2); (ii) posaconazol (código PDB 3K1O); (iii) VNF (código PDB 3KSW).

A estrutura de escolha para a realização do estudo foi a 3KSW, devido à atividade comprovada do VNF contra o *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo* (LEPESHEVA et al., 2010). Tanto o fluconazol quanto o posaconazol apresentam propriedades/características que não são interessantes ao objetivo desse trabalho. Estudos anteriores demonstraram que o fluconazol só apresentou atividade *in vitro* contra o *T. cruzi*, apresentando pouca atividade *in vivo*. Já o posaconazol, é um fármaco com estrutura muito grande (700,8 daltons), e que foge à Regra dos Cinco de Lipinski. Essa regra diz que uma molécula para ter atividade farmacológica, quando administrada por via oral, deve possuir um peso molecular menor que 500 daltons, coeficiente de partição óleo/água (cLogP) menor que 5, no máximo 5 doadores de ligação de hidrogênio e no máximo 10 aceptores de ligação de hidrogênio. (ASHLEY, CURRIE, 2009; LIPINSKI, 2000). Por esses motivos decidiu-se não trabalhar com as estruturas 2WX2 e 3K1O.

Para a triagem virtual baseada na estrutura do receptor utilizou-se uma metodologia híbrida. Essa metodologia é diferente de outros métodos de *docking*, pois utiliza informações do ligante e da proteína para melhorar o desempenho da triagem. As informações de ligação durante o processo de *docking* são descritas pela função de *Score Chemical Gaussian Overlay*, que dá scores das poses baseadas em como a molécula se sobrepõe a forma do ligante, calculando o quanto essa molécula mimetiza as mesmas interações de hidrogênio e interações que o ligante faz. Depois da busca exaustiva, a otimização é feita utilizando outra função de score, a *chemgauss3*, que considera as interações da molécula com o receptor. O *score* final vem dessa metodologia híbrida, garantindo maior confiabilidade aos resultados. Os parâmetros de procura funcionam fazendo *docking* das estruturas do banco de dados de forma exaustiva e rotacional com no máximo 1 Å de liberdade (McGAUGHEY, et al., 2007).

Ao final dessa triagem inicial, gerou-se um arquivo com os com quinhentos

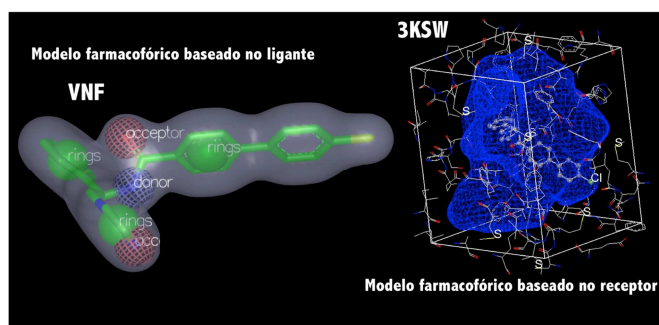


melhores HITS dessa busca exaustiva. Posteriormente, esses 500 hits foram redocados a fim de se aperfeiçoar os resultados, reduzindo os parâmetros translacionais e rotacionais para 0,5 Å.

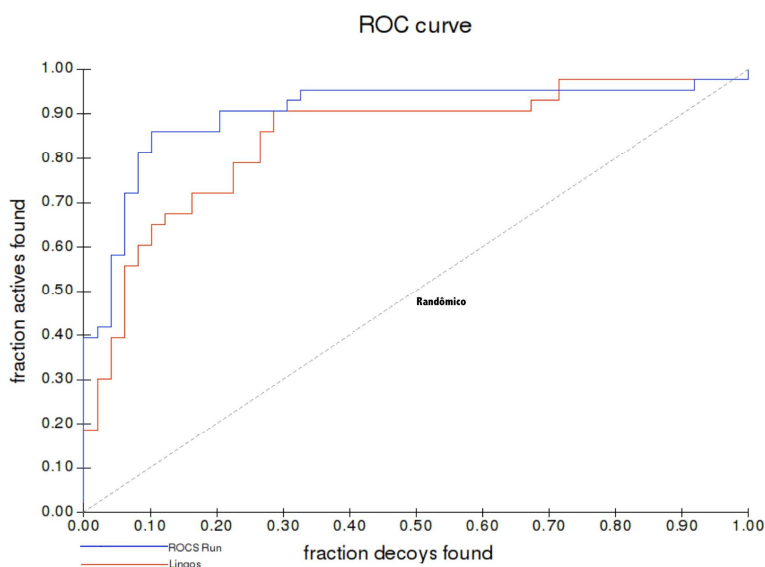
Diversos modelos farmacofóricos baseados na estrutura do ligante foram gerados, testados e avaliados, usando tanto o VNF quanto outros ligantes bioativos. Os modelos foram avaliados com base em um subconjunto de moléculas selecionadas como ligantes ativos e *decoys* (ligantes inativos ou substratos) da enzima CYP51<sub>TC</sub>. O melhor modelo foi aquele capaz de diferenciar os ligantes ativos como ativos e os *decoys* como inativos. Dessa maneira, o modelo farmacofórico gerado com maior confiabilidade foi construído utilizando o ligante VNF, e apresentou dois pontos aceptores de ligação de hidrogênio, um ponto doador de ligação de hidrogênio e três centros aromáticos (Figura 4). Ao ser avaliado, este modelo apresentou uma área sob a curva (AUC) de 0,902, atingindo 95% de confiança (Gráfico 1). A área sob a curva demonstrada no gráfico representa a quantidade de moléculas ativas que o modelo farmacofórico foi capaz de reconhecer como ativas, e de *decoys* que o modelo foi capaz de reconhecer como inativas.

A triagem virtual utilizando o modelo farmacofórico selecionado filtrou o banco de dados com cerca de 50 milhões de confôrmeros. O programa ROCS avalia as estruturas fazendo uma sobreposição dos seus centros de massa, utilizando descritores moleculares para avaliar a similaridade eletrostática da molécula em análise com o ligante. Posteriormente repontuou-se os resultados obtidos no ROCS no programa EON, que considera 30% dos scores de *Tanimoto Combo* para pontuar as moléculas (HAWKINS, 2010).

O banco de dados escolhido para esse trabalho foi o da *ChemBrigde database* (San Diego, California, USA) por estar disponível gratuitamente e por conter, em sua maioria, compostos *drug-like*, ou seja, que possuem características que seguem a Regra dos Cinco de Lipinski, que são comuns à grande maioria dos fármacos.



**Figura 4.** Modelos farmacofóricos utilizados neste estudo. Modelo baseado na estrutura do ligante bioativo VNF (LBDD) e modelo baseado na estrutura do receptor (SBDD).



**Gráfico 1.** Curva de enriquecimento (AUC) baseada nos resultados do conjunto de ligantes e *decoys* para a enzima CYP51<sub>TC</sub> apresentando AUC de 0,902, dando confiabilidade de 95% ao modelo farmacofórico.

Ao final do processo de triagem virtual fez-se um consenso dos resultados obtidos, o que permitiu a seleção de 30 compostos com maior pontuação. Estes compostos estão em processo de aquisição comercial para realização de estudos *in vitro* de inibição enzimática com a enzima CYP51 de *T. cruzi*.

## 5. CONCLUSÃO

Os modelos farmacofóricos da enzima CYP51<sub>TC</sub> foram gerados utilizando-se metodologias baseadas na estrutura do ligante (LBDD) e do receptor (SBDD). Tais modelos foram avaliados e validados. Ao final, estes modelos foram utilizados como filtros moleculares 3D em um processo de triagem virtual a partir da base de dados de compostos comerciais da *ChemBrigde database*.

A aplicação com sucesso deste método resultou na seleção de 30 compostos, candidatos a inibidores da enzima alvo do parasita, que estão em fase de aquisição para realização dos ensaios de triagem bioquímica com a enzima CYP51<sub>TC</sub>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASHLEY, C.; CURRIE, A. **The Renal Drug Handbook**. 3rd ed. Oxford (UK): Radcliffe Medical Press, 2009.

BEYRER, C.; VILLAR, J. C.; SUWANVANICHKIJ, V.; SINGH, S.; BARAL, S. D; MILLS, E. J.. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. **Lancet**, v. 370, p. 619-627, 2007.

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

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

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

FRED 2.2.5 MANUAL. Fast Rigid Exhaustive Docking. **OpenEye Scientific Software, Inc.** 2009.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. **Curr. Med. Chem.**, v.15, p.37-26, 2008.

HAWKINS, P. C. D., SKILLMAN, A. G., WARREN, G. L., ELLINGSON, B. A., STAHL, M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 11, p. 572-584, 2010.

KAPETANOVIC, I. M. Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach. **Chemico-biological interactions**, v. 171(2), p. 165-76, 2008.

KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. **Drug Discov. Today**, v.11, p. 580-594, 2006.

KUBINYI, H. (ED.) **3D QSAR in drug design**: Theory, methods and applications. Leiden: ESCOM, 1993. 759 p.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

LAZARDI, K.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, Ketoconazole and Terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p. 2097-2105, 1990.

LEPESHEVA, G. I.; HARGROVE, T. Y.; ANDERSON, S.; KLESHCHENKO, Y.; FURTAK, V.; WAWRZAK, Z.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. Sterol 14  $\alpha$ -demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. **Chemistry & Biology**, v. 14, p. 1283-1293, 2007.

LEPESHEVA, G. I.; ROBERT, D. O.; HARGROVE, T. Y.; KLESHCHENKO, Y.; SHUSTER, I.; NES, W. D.; HILL, G. C.; VILLALTA, F.; WATERMAN, M. R. Structural

insights into inhibition of sterol 14  $\alpha$ -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** v. 285, p. 25582-25590, 2010.

LIPINSKI, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 44(1), p. 235-49, 2000

McGAUGHEY, G.B.; SHERIDAN, R.P; BAYLY, C.I.; CULBERSON, J.C.; KREATSOULAS, C.; LINDSLEY, S.; MAIOROV, V.; TRUCHON, J.F.; CORNELL, W.D.; Comparison of Topological, Shape, and Docking Methods in Virtual Screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 47, p. 1504-1519, 2007.

McKERRROW, J. H.; DOYLE, P. S.; ENGEL, J. C.; PODUST, L. M.; ROBERTSON, S. A.; FERREIRA, R.; SAXTON, T.; ARKIN, M.; KERR, I. D.; BRINEN, L. S.; CRAIK, C. S. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.104, p. 263-269, 2009.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 100, p. 663-677, 2006.

MOREL, C. M. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p 3-16, 1999.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; LITTLE, W. C.; XAVIER, S. S.; RASSI, S. G.; RASSI, A. G.; SOUSA, A. S.; SCANAVACCA, M. I. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. **New England J. Med.**, v. 355, p. 799-808, 2006.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. 2009. Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 152-158, 2009.

SOARES, M. B. P.; DOS SANTOS, R. R. Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 104, p. 325-332, 2009.

SONG, C. M.; LIM, S. J.; TONG, J. C. Recent advances in computer-aided drug design. **Briefings in Bioinformatics**, v. 10(5), p. 579-91, 2009.

URBINA, J. A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 311-318, 2009.

WHO/TDR – World Health Organization – **Special Programme for Research and Training in Tropical Disease**, 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/index.html>>. Acesso em: 06 nov. 2010.

WHO – World Health Organization – Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **First WHO report on neglected tropical diseases**, 2010. Disponível em: <[http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/NTD\\_2010report\\_web.pdf](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/NTD_2010report_web.pdf)>. Acesso em: 09 nov. 2010.