



UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

NOEMI DE JESUS HILLER

SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE BORONO-TIRFOSTINAS

Niterói-RJ
2020

UFF - UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

NOEMI DE JESUS HILLER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química Orgânica

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Daniela de Luna Martins

COORIENTADOR: Dr. Robson Xavier Faria

Niterói-RJ
2020

H652s Hiller, Noemi de Jesus
Síntese e avaliação biológica de borono-tirfostinas /
Noemi de Jesus Hiller ; Daniela de Luna Martins, orientadora ;
Robson Xavier Faria, coorientador. Niterói, 2020.
291 p. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2020.

DOI: <http://dx.doi.org/10.22409/PPGQ.2020.m.15407643707>

1. Ácidos borônicos. 2. Anticâncer. 3. Tripancida. 4. Anti-
inflamatório. 5. Produção intelectual. I. Martins, Daniela
de Luna, orientadora. II. Faria, Robson Xavier, coorientador.
III. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Química.
IV. Título.

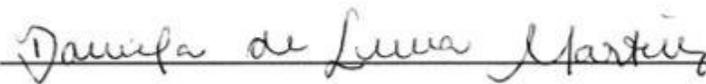
CDD -

Bibliotecário responsável: Sandra Lopes Coelho - CRB7/3389

NOEMI DE JESUS HILLER

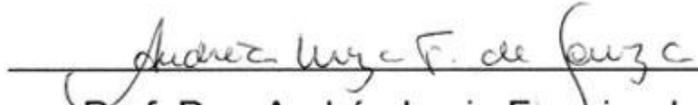
SÍNTESE E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE BORONO-TIRFOSTINAS

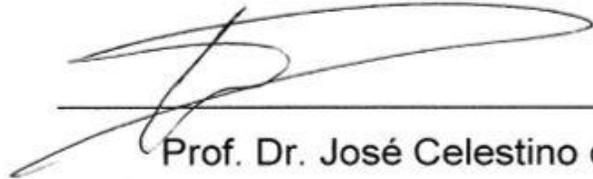
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Daniela de Luna Martins (Orientadora)-IQ/UFF


Dr. Robson Xavier Faria (Coorientador)-Fiocruz


Prof. Dr. Fernando Martins dos Santos Jr.-IQ/UFF


Prof. Dra. Andréa Luzia Ferreira de Souza-IQ/UFRJ


Prof. Dr. José Celestino de Barros Neto-IQ/UFRJ

Niterói-RJ

Março/2020

Dedico este trabalho à minha família por compartilhar meus sonhos e por me incentivar a cada dia a ser uma pessoa e uma profissional melhor. Aos meus amigos, que foram decisivos no meu progresso, pelo companheirismo, ajuda e força que me deram para que eu pudesse cumprir mais esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, o autor da minha vida, por Sua graça e bondade, pela Sua força nos tempos de dificuldade e por Sua alegria diária. Porque sem Ele nada disso seria possível.

Agradeço aos meus pais, Alexandre Guimarães Hiller e Virgínia Lucia de Jesus Hiller, pela sabedoria e ensinamentos transmitidos, por me formar e me educar nos mínimos detalhes. Muito obrigado pelo carinho, dedicação e preocupação, pelas noites mal dormidas, pelas orações, por todo esforço, por todo amor, por todo incentivo. Agradeço a minha família em geral, que não se restringe ao sangue, por estarem sempre presentes.

Ao meu marido, Pedro Henrique V. de Sousa, por acreditar em mim, mesmo quando eu não acredito. Obrigado por ser meu maior incentivador, por estar ao meu lado em todos os momentos me dando esperança, alegria e muita comida. Muito obrigado pelo amor e pela amizade, você é imprescindível.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Daniela de Luna Martins, por ser um exemplo de força, dedicação e perseverança. Agradeço pelo incentivo e conhecimento transmitido. Muito obrigado por sempre me dar o melhor, pelas milhões de correções, pelas horas sem fim de dedicação com o objetivo de me ensinar e me passar toda sua sabedoria. Não sei como te agradecer o suficiente.

Ao meu coorientador Prof. Robson Xavier Faria muito obrigado, por todo esforço, paciência e tempo gasto em me ensinar e em responder minhas infindáveis perguntas sobre biologia.

A todos que fizeram parte do Grupo de Pesquisa em Catálise e Síntese de pesquisa (Grupo CSI), e aos alunos de outro(s) grupo(s) de pesquisa com quem compartilhei o espaço do Laboratório 413, pela amizade, incentivo e ajuda que foram importantíssimas para realizar este trabalho.

Aos professores da Universidade Federal Fluminense pelos ensinamentos transmitidos durante o curso de Mestrado em Química no PPGQ-UFF. Aos técnicos que trabalham no LaReMN fornecendo as análises de RMN e aos técnicos que fornecem as análises de IV.

À banca examinadora constituída pelos professores Dr^a. Andréa Luzia Ferreira de Souza e Dr. Tiago Lima da Silva por aceitarem o convite para compor como titulares a

banca avaliadora de minha dissertação, pelo tempo dedicado a ler meu trabalho e pelas sugestões e correções. E ao Dr. José Celestino de Barros Neto e ao professor Dr. Fernando Martins dos Santos Jr. por aceitarem compor como membros suplentes da banca avaliadora e por suas contribuições.

A todos que, de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Em geral, a todos que passaram pela minha vida, me influenciando de alguma forma, meu muito obrigado.

“Feliz o homem que acha sabedoria, e o homem que adquire conhecimento; porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata, e melhor a sua renda do que o ouro mais fino. Mais preciosa é do que pérolas, e tudo o que podes desejar não é comparável a ela.”

(Provérbios 3:13-15)

RESUMO

No presente trabalho, descreve-se a síntese de benzeno-vinilnitrilas conhecidas (R = 81-98%, tirfostinas) e de ácidos borônicos de *E*-(benzeno-vinilnitrilas) inéditos (R = 84-91%, borono-tirfostinas) através da condensação de Knoevenagel em água sem uso de catalisador. Tanto a reação quanto o isolamento foram realizados sem emprego de solventes orgânicos. Uma vez que as moléculas preparadas possuem em sua estrutura uma porção benzeno-vinilnitrila, são consideradas membros da família das tirfostinas, as quais são conhecidas por inibirem a fosforilação de diferentes tirosinas quinases. Essas proteínas são alvos moleculares importantes em doenças inflamatórias e doenças com componente inflamatório proeminente, tais como Câncer e Doença de Chagas. O receptor P2X7 (P2X7R) é um outro alvo terapêutico estratégico para o desenvolvimento de anti-inflamatórios. Uma série **NO** composta de quatro análogos de ácidos borônicos (borono-tirfostinas) e seis benzeno-vinilnitrilas (tirfostinas sem o boro) foi avaliada quanto ao seu efeito sobre o P2X7R de humano e de camundongo. Verificou-se a importância do grupo farmacofórico (B(OH)₂) na atividade biológica. Os ácidos borônicos (**65a**) **NO-01** e (**65c**) **NO-12** inibiram *in vitro* a função do P2X7R de humano (**65a**: IC₅₀ = 0,021 µM; **65c**: 0,243 µM) e de camundongo (**65a**: IC₅₀ = 0,042 µM; **65c**: 0,537 µM). Esses análogos apresentaram um efeito melhor, ou similar ao obtido pelos antagonistas do P2X7R BBG e A740003 nos testes de captação de corante, liberação de IL-1β *in vitro* e edema de pata de camundongo induzido por ATP *in vivo*. O (**65a**) **NO-01** apresentou os melhores resultados da série, tanto nos ensaios *in vitro* quanto nos *in vivo*. O *docking* molecular sugere a interação entre os NO's e a parte superior do poro do P2X7R através de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Esses resultados indicam que o (**65a**) **NO-01** pode ser utilizado como protótipo no desenvolvimento de outros inibidores do P2X7R. A atividade anticâncer (**65c**: IC₅₀ = 0,14 µM células GH3) e tripanocida (**65c**: EC₅₀ = 0,795 µM, Cepa Y) *in vitro* da série **NO** foi avaliada, demonstrando a importância da introdução da unidade B(OH)₂ no aumento da atividade biológica das tirfostinas obtidas. **Palavras-chave:** P2X7R; Tirosina quinase; Ácidos borônicos; Benzeno-vinilnitrilas; Tirfostinas

ABSTRACT

In the present work, it is described the synthesis of well-known cyanovinylbenzenes (R = 81-98%) and novel *E*-(cyanovinyl)benzeneboronic acids (R = 84-91%) through Knoevenagel condensations without catalysts, and in water. This simple protocol completely avoided the use of organic solvents in the synthesis and in the work-up process. The molecules synthesized enclose an aryl-cyanovinyl moiety in its structure; therefore, are recognized as members of the tyrphostins family, that is known to inhibit tyrosine kinase family phosphorylation. These proteins are important targets in inflammatory diseases and inflammation-correlated diseases, such as Cancer and Chagas's disease. Another important target in inflammation is the P2X7 receptor (P2X7R). Currently, the P2X7R has been studied as a potential therapeutic target of anti-inflammatory drugs. Based on this, a **NO** series composed of four boronic acids analogs (boronic-tyrphostins) and six benzene-vinylnitriles (tyrphostins) were evaluated on the biologic effect on the human and murine P2X7R. The importance of the pharmacophoric group (B(OH)₂) was evaluated. The boronic acids derivatives (**65a**) **NO-01** and (**65c**) **NO-12** inhibited *in vitro* human (**65a**: IC₅₀ = 0,021 μM; **65c**: 0,243 μM) and murine (**65a**: IC₅₀ = 0,042 μM; **65c**: 0,537 μM) P2X7R function. These analogs compounds showed better or similar effects than known P2X7R antagonists BBG and A740003 for inhibiting dye uptake, *in vitro* IL-1β release and ATP-induced paw edema *in vivo*. In both, *in vitro* and *in vivo* assays, the (**65a**) **NO-01** showed the best results. The molecular *docking* suggests that the NO derivatives bind into the upper body domain of the P2X7 pore and that the main intermolecular interaction with the two most active NO derivatives occurs by hydrophobic interactions and hydrogen bonds. These results indicate that the boronic acid derivative (**65a**) **NO-01** shows the lead compound characteristics to be used as a scaffold structure to the development of new P2X7R inhibitors with anti-inflammatory action. *In vitro* anticancer (**65c**: IC₅₀ = 0,14 μM against GH3 cell line) and trypanocidal activities (**65c**: EC₅₀ = 0,795 μM; Y strain epimastigote) of the synthesized boronic acids (boronic-tyrphostins) were also evaluated demonstrating that the introduction of the boronic acid functionality can improve the activity of the tyrphostins.

Keywords: P2X7R; Tyrosine kinase; Boronic acids; Cyanovinylbenzenes; Tyrphostins

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 1	- Causas e consequências da falha da resolução da inflamação.....	25
Figura 2	- Exemplos de componentes da inflamação.....	26
Figura 3	- Fase vascular e celular do processo inflamatório.....	28
Figura 4	- Estrutura química de alguns AINES.....	33
Figura 5	- Estrutura química de alguns glicocorticoides naturais (14) e sintéticos (15, 16 e 17).....	35
Figura 6	- Ativação da rota JAK-STAT e produção de citocinas.....	39
Figura 7	- Gráfico de mortalidade proporcional não ajustada por todas as neoplasias, de homens e mulheres, no Brasil (2014 e 2017).....	43
Figura 8	- Sinalização em células normais versus células tumorais.....	45
Figura 9	- Correlações entre inflamação e câncer.....	48
Figura 10	- Estrutura do Benznidazol (18) e do Nifurtimox (19).....	55
Figura 11	- Ciclo de vida do <i>Trypanossoma cruzi</i>	57
Figura 12	- Agonista natural e sintético do P2X7R.....	61
Figura 13	- P2X7R como possível alvo terapêutico para diversas doenças.....	63
Figura 14	- Estrutura química de antagonistas do P2X7R.....	64
Figura 15	- Estrutura básica dos receptores tirosina quinase e características específicas de algumas famílias.....	68
Figura 16	- Mecanismo de ativação fisiológica e oncogênica.....	69
Figura 17	- Representação da tirosina quinase não-receptora SRC.....	72
Figura 18	- Primeiros compostos testados como inibidores de tirosina quinase e <i>design</i> de benzeno-vinilnitrilas.....	75
Figura 19	- Exemplos de benzeno-vinilnitrilas com atividade inibitória frente ao EGFR.....	76
Figura 20	- Estrutura do Bortezomibe (Velcade®) e do Ixazomibe (Ninlaro®).....	80
Figura 21	- Compostos de boro.....	81
Figura 22	- Estrutura dos ácidos borônicos.....	83
Figura 23	- Semelhanças entre as interações proteína alvo/ácido borônico e proteína/ácido carboxílico.....	88
Figura 24	- Anel β -lactama e inibidores de enzimas β -lactamases.....	89
Figura 25	- Estrutura da combretastatina A-4, da colchicina e dos análogos borônicos da CA-4.....	92
Figura 26	- Z-Estilbenos borônicos com atividade anti-proliferativa.....	92
Figura 27	- Ácido arilborônico inibidor de EGFR ²³⁰	93
Figura 28	- Ácidos borônicos de quindolinas avaliados para o vírus da influenza A.....	94
Figura 29	- Ativação do metileno por grupos retiradores de elétrons (GRE), exemplos de metilenos ativos.....	96
Figura 30	- Tirfostinas e borono-tirfostinas obtidas por condensação de Knoevenagel.....	100
Figura 31	- Híbrido de ressonância do composto 64d.....	107

Figura 32 - Absorção e cores de algumas benzeno-vinilnitrilas no UV/vis	108
Figura 33 - Sistema <i>push-pull</i> (D- π -A).....	108
Figura 34 - Série de cores das benzeno-vinilnitrilas	108
Figura 35 - Efeitos que influenciam o valor de estiramento axial das nitrilas.....	114
Figura 36 - Espectro de IV do aldeído de partida ácido 4-formilfenilborônico (63a)	115
Figura 37 - Efeitos que alteram a frequência da ligação C=O de ésteres	116
Figura 38 - Espectro de IV do composto 65c e comparação com a figura 36	117
Figura 39 - Espectros de ^1H -RMN dos aldeídos de partida em DMSO, 500 MHz: A) ácido 4-formilfenilborônico (63a) B) ácido 3-formilfenilborônico (63b)	119
Figura 40 - Espectro de ^1H -RMN e comparação das borono-tirfostinas obtidas	121
Figura 41 - Experimento de troca de deutério do composto 65d	122
Figura 42 - Espectro de HSQC do composto 65d	123
Figura 43 - Cristalização do 65b	125
Figura 44 - Composto 65a (NO-01)	127
Figura 45 - Composto 65b (NO-03)	127
Figura 46 - Composto 65c (NO-12)	128
Figura 47 - Composto 65d (NO-13).....	128
Figura 48 - Molécula 65a no plano formado pelo anel aromático	130
Figura 49 - Molécula 65b no plano formado pelo anel aromático	131
Figura 50 - Molécula 65c no plano formado pelo anel aromático	131
Figura 51 - Molécula 65d no plano formado pelo anel aromático.....	131
Figura 52 - Superfície de Hirshfeld para o 65a	133
Figura 53 - Superfície de Hirshfeld para o 65b	134
Figura 54 - Superfície de Hirshfeld para o 65c	134
Figura 55 - Superfície de Hirshfeld para o 65d	134
Figura 56 - Gráfico “ <i>heatmap</i> ”	136
Figura 57 - Posição de interação entre a borono-tirfostina 65a (NO-01) e a DYRK1a sugerida pelo estudo de <i>docking</i>	137
Figura 58 - Compostos padrão para as linhagens GH3 e U937	141
Figura 59 - Transformação do MTT em <i>formazan</i>	143
Figura 60 - Atividade tripanocida. As formas epimastigotas da cepa Y foram tratadas com os NOs, todos na concentração 10 μM por 72 h.	144
Figura 61 - Atividade tripanocida.	145
Figura 62 - Estrutura do composto 65c , dos compostos utilizados no tratamento da Doença de Chagas e seus respectivos EC_{50} sobre a cepa Y	145
Figura 63 - Inibição da liberação de IL-1 β induzida por ATP pelos ácidos arilborônicos em células de humanos e de camundongos.	152
Figura 64 - Avaliação do mecanismo inibitório dos compostos 65a (NO-01) e 65c (NO-12) como antagonistas do P2X7R.....	153
Figura 65 - Representação dos sítios de interação (S1, S2 e S3) identificados no receptor P2X7.....	155
Figura 66 - Superposição dos inibidores 65a (NO-01), 65c (NO-12), 64c (NO-06) e 65d (NO-13) ancorados na cavidade S2.	156

Figura 67 - Representação das principais interações intermoleculares de cada benzeno- vinilnitrila (65a (NO-01) , 65c (NO-12) , 64c (NO-06) e 65d (NO-13)) avaliada na cavidade S2, identificadas por <i>docking</i> molecular.	157
Figura 68 - Efeito anti-inflamatório em edema de pata induzido por ATP dos compostos 65a (NO-01) e 65c (NO-12)	160
Figura 69 - Espectro de ¹ H-RMN do 64a usando CDCl ₃ como solvente	167
Figura 70 - Espectro de APT do 64a usando CDCl ₃ como solvente (CH e CH ₃ para cima)	168
Figura 71 - Espectro de HSQC ¹ H versus ¹³ C do 64a usando CDCl ₃ como solvente..	169
Figura 72 - Espectro de IV do produto 64a	170
Figura 73 - Espectro de UV do 64a	171
Figura 74 - Espectro de ¹ H-RMN do 64b usando CDCl ₃ como solvente	173
Figura 75 - Espectro de APT do 64b usando CDCl ₃ como solvente (CH e CH ₃ para baixo)	174
Figura 76 - Espectro de HSQC ¹ H versus ¹³ C do 64b usando CDCl ₃ como solvente .	175
Figura 77 - Espectro de IV do produto 64f	176
Figura 78 - Espectro de UV do 64b	177
Figura 79 - Espectro de ¹ H-RMN do 64c usando CDCl ₃ como solvente	179
Figura 80 - Espectro de APT do 64c usando CDCl ₃ como solvente (CH e CH ₃ para baixo)	180
Figura 81 - Espectro de HSQC ¹ H versus ¹³ C do 64c usando CDCl ₃ como solvente..	181
Figura 82 - Espectro de IV do produto 64c	182
Figura 83 - Espectro de UV do 64c	183
Figura 84 - Espectro de ¹ H-RMN do 64d usando CDCl ₃ como solvente	185
Figura 85 - Espectro de APT do 64d usando CDCl ₃ como solvente (CH e CH ₃ para baixo)	186
Figura 86 - Espectro de HSQC ¹ H versus ¹³ C do 64d usando CDCl ₃ como solvente .	187
Figura 87 - Espectro de IV do produto 64d	188
Figura 88 - Espectro de UV do 64d	189
Figura 89 - Espectro de ¹ H-RMN do 64e usando CDCl ₃ como solvente	191
Figura 90 - Espectro de APT do 64e usando CDCl ₃ como solvente (CH e CH ₃ para cima)	192
Figura 91 - Espectro de HSQC ¹ H versus ¹³ C do 64e usando CDCl ₃ como solvente..	193
Figura 92 - Espectro de IV do produto 64e	194
Figura 93 - Espectro de UV do 64e	195
Figura 94 - Espectro de ¹ H-RMN do 64f usando CDCl ₃ como solvente	197
Figura 95 - Espectro de APT do 64f usando CDCl ₃ como solvente (CH e CH ₃ para baixo)	198
Figura 96 - Espectro de HSQC ¹ H versus ¹³ C do 64f usando CDCl ₃ como solvente ..	199
Figura 97 - Espectro de IV do produto 64f	200
Figura 98 - Espectro de ¹ H-RMN do 65a usando DMSO como solvente.	203
Figura 99 - Espectro de APT do 65a usando DMSO como solvente (CH e CH ₃ para baixo)	204

Figura 100 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do 65a usando DMSO como solvente	205
Figura 101 - Espectro de IV do produto 65a	206
Figura 102 – Difração de raio-x para cristal do composto 65a	207
Figura 103 - Espectro de ^1H -RMN do 65b usando DMSO como solvente	209
Figura 104 - Espectro de APT do 65b usando DMSO como solvente (CH e CH_3 para baixo).....	210
Figura 105 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do 65b usando DMSO como solvente	211
Figura 106 - Espectro de IV do produto 65b	212
Figura 107 – Difração de raio-x para cristal do composto 65b	213
Figura 108 - Espectro de ^1H -RMN do 65c usando DMSO como solvente.....	215
Figura 109 - Espectro de ^{13}C -RMN do 65c usando DMSO como solvente	216
Figura 110 - Espectro de APT do 65c usando DMSO como solvente (CH e CH_3 para baixo).....	217
Figura 111 - Espectro de HSQC do 65c usando DMSO como solvente	218
Figura 112 - Espectro de IV do produto 65c	219
Figura 113 – Difração de raio-x para cristal do composto 65c	220
Figura 114 - Espectro de ^1H -RMN do 65d usando acetona como solvente	222
Figura 115 - Espectro de ^1H -RMN do 65d usando DMSO como solvente	223
Figura 116 - Espectro de APT do 65d usando DMSO como solvente (CH e CH_3 para cima).....	224
Figura 117 - Espectro de HSQC do 65d usando DMSO como solvente	225
Figura 118 - Espectro de IV do produto 65d	226
Figura 119 – Difração de raio-x para cristal do composto 65d	227

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema	Título	Página
Esquema 1	<i>Via de síntese de algumas prostaglandinas e alvo molecular dos AINES e AIES¹⁰</i>	31
Esquema 2	Fases clínicas e estágios da Doença de Chagas	52
Esquema 3	Representação do mecanismo de ativação dos receptores P2X	60
Esquema 4	Fosforilação do resíduo de tirosina (Y) pela tirosina quinase (TK)	66
Esquema 5	Reações de desidratação e esterificação sofridas por ácidos borônicos	82
Esquema 6	Reação entre a água e ácidos borônicos	83
Esquema 7	Acidez de Lewis dos ácidos borônicos e analogia ao estado de transição (E.T. [‡]) de proteases	85
Esquema 8	Esquema de intermediários da hidrólise de um antibiótico β -lactâmico por uma serino β -lactamase	90
Esquema 9	Primeira reação de condensação de Knoevenagel	95
Esquema 10	Esquema de intermediários da reação de Knoevenagel em meio básico	95
Esquema 11	Utilização da condensação de Knoevenagel para síntese de compostos com importância farmacêutica	97
Esquema 12	Catalisadores ambientalmente benignos	98
Esquema 13	Estratégias adotadas no trabalho	100
Esquema 14	Benzeno-vininitrilas por condensação de Knoevenagel em água	102
Esquema 15	Obtenção de benzeno-vinilnitrilas sem boro	104
Esquema 16	Obtenção de ácidos borônicos	110
Esquema 17	Processo de desidratação e ciclização do composto 65d	113
Esquema 18	Transformação do ambiente químico do hidrogênio	120
Esquema 19	Avaliação da viabilidade celular por redução de resazurina	138
Esquema 20	Possíveis interações entre a cruzaina e as tirfostinas sintetizadas	146

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Título	Página
Tabela 1	Diferenças entre o processo inflamatório agudo e o crônico	25
Tabela 2	Efeitos colaterais comuns devido ao uso prolongado ou altas concentrações de GC.....	36
Tabela 3	Diferentes tipos de doenças inflamatórias crônicas e seu local de inflamação	41
Tabela 4	Números estimados para 2018 dos dez tipos de câncer mais incidentes separados por gênero	44
Tabela 5	Oncogenes como alvos moleculares no tratamento de câncer	46
Tabela 6	Estimativa de gastos federais com serviços oncológicos nos anos de 1999, 2009 e 2018	50
Tabela 7	Família das tirosinas quinases.....	66
Tabela 8	Moléculas inibidoras de tirosina quinase aprovadas pela FDA.....	78
Tabela 9	Energias e comprimentos de ligação padrão	81
Tabela 10	Constante de ionização para alguns ácidos borônicos	84
Tabela 11	Benzeno-vinilnitrila sintetizadas	105
Tabela 12	Benzeno vinilnitrilas contendo a porção borono (borono-tirfostinas) sintetizadas	111
Tabela 13	Dados cristalográficos.....	126
Tabela 14	Ângulos de torção	129
Tabela 15	Ligações de Hidrogênio	132
Tabela 16	Toxicidade e efeito antiproliferativo das benzeno-vinilnitrilas	139
Tabela 17	Efeito dose-resposta das benzeno-vinilnitrilas frente à proliferação de células de mamíferos	140
Tabela 18	Efeito antagonista dos inibidores de P2X7R e da série de compostos NO frente à captação de corante induzida por ATP em macrófagos peritoneais	148
Tabela 19	Toxicidade celular e seletividade dos inibidores de P2X7R e dos análogos de ácidos arilborônicos.....	149
Tabela 20	Avaliação do efeito inibitório dos análogos de ácidos borônicos e dos antagonistas do P2X7R através da avaliação da diminuição da captação de PI em células HEK 293 e da liberação de IL-1 β em células THP-1 e macrófagos de camundongos.	151
Tabela 21	Estabilidade em microssoma hepático (MH) e permeabilidade em Caco-2 dos compostos 65a (NO-01) e 65c (NO-12)	154
Tabela 22	Solubilidade de 65a (NO-01) e 65c (NO-12) em diferentes valores de pH	154
Tabela 23	LogD _{7,4} das borono-tirfostinas 65a (NO-01) e 65c (NO-12)	154
Tabela 24	Volume das cavidades identificadas em P2X7R de humano	155

ABREVIATURAS E SIGLAS

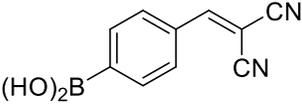
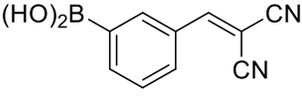
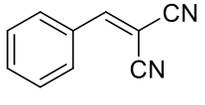
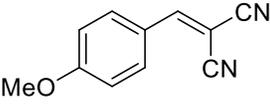
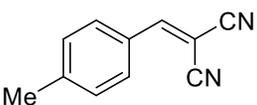
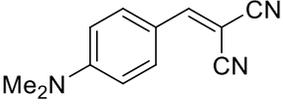
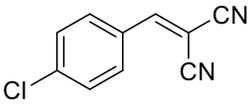
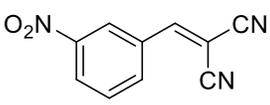
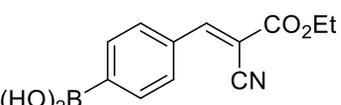
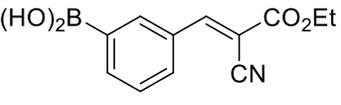
Abreviatura	Significado
¹³ C-RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
¹ H-RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
AA	Ácido araquidônico
ADMET	absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ADP	Adenosina difosfato
AHMS	Ácido hidroximetanossulfônico
AIES	Anti-inflamatórios esteroidais
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
Ar	Arila
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BBG	Brilliant blue G
BzATP	2'3'-(benzoil-4-benzoil)-adenosina-5'-trifosfato
Bzd	Benznidazol
CA-4	Combretastatina A-4
c.c.f.	Cromatografia em camada fina
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
COX	Ciclooxigenase
cP2X7R	Receptor P2X7 de camundongo
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos

D.P.	Desvio Padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DYRK1a	<i>Dual specificity tyrosine(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1a</i>
EC ₅₀	Concentração do fármaco para induzir 50% do efeito máximo
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (Receptor de fator de crescimento epidérmico)
E.T.‡	Estado de transição
FDA	<i>Federal Drug Administration</i> (Administração Federal de Comidas e Remédios)
GC	Glicocorticoides
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
GRE	Grupo retirador de elétrons
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor-type 2</i> (Receptor do fator de crescimento epidérmico humano-tipo 2)
hERG	<i>Human Ether-a-go-go-Related Gene</i>
hP2X7R	Receptor P2X7 de humano
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> (correlação heteronuclear de um único quantum)
IC ₅₀	Concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo
IL	Interleucina
INF-γ	Interferon gamma

IP	Iodeto de propídeo
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
JAK	Janus quinase
LAME	Laboratório Multiusuário de Espectroscopia
LDH	Lactato desidrogenase
Leu	Leucina
LI	Líquidos iônicos
LPS	Lipopolissacarídeo
LY	<i>Lucifer Yellow</i> (Amarelo de Lúcifer)
Lys	Lisina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MH	Microsoma hepático
MTT	Brometo de tetrazólio
NF-κB	Fator nuclear Kappa B
NRTKs	<i>Non-receptor tyrosine kinase</i> (Tirosina quinase não-receptora)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PF	Ponto de fusão
Phe	Fenilalanina
PI	Iodeto de propídeo
PK	Proteína quinase
PMA	<i>Phorbol-12-myristate acetate</i> (Acetato miristato de forbol)

PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
R (%)	Rendimento
RTKs	<i>Receptor tyrosine kinase</i> (Tirosina quinase receptora)
S.I.	Índice de seletividade
Ser	Serina
SNC	Sistema nervoso central
Src	Sarcoma
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
SUS	Sistema único de saúde
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanossoma cruzi</i>
TK	Tirosina quinase
TLR	Receptor semelhante a <i>Toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TX-100	Triton X-100
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
v_{ass}	Deformação axial assimétrica
v_s	Deformação axial simétrica
Δ	Deformação angular
δ ppm	Deslocamento químico em partes por milhão
δ_{ip}	Deformação angular no plano
δ_{oop}	Deformação angular fora do plano

CÓDIGO E ESTRUTURA QUÍMICAS DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS

Código	Estrutura dos compostos sintetizados
(65a) NO-01	
(65b) NO-03	
(64a) NO-04	
(64b) NO-05	
(64c) NO-06	
(64d) NO-07	
(64e) NO-08	
(64f) NO-11	
(65c) NO-12	
(65d) NO-13	

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xv
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
CÓDIGO E ESTRUTURA QUÍMICAS DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS	xxi
SUMÁRIO.....	xxii
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Inflamação.....	24
1.1.1. <u>Ciclooxigenases</u>	30
A) AINES.....	32
B) AIES	34
1.1.2. <u>A liberação de interleucina-1β via NLP3/P2X7R</u>	37
1.1.3. <u>Liberação de mediadores inflamatórios via proteína quinase</u>	38
1.1.4. <u>Doenças inflamatórias crônicas</u>	40
1.1.5. <u>Câncer</u>	42
1.1.6. <u>Doença de Chagas</u>	50
1.2. Receptores purinérgicos.....	58
1.2.1. <u>Receptor P2X7 (P2X7R)</u>	60
1.3. Tirosina Quinase	65
1.3.1. <u>Tirosinas quinases receptoras (RTKs)</u>	67
1.3.2. <u>Tirosinas quinases não-receptoras (NRTKs)</u>	71
1.3.3. <u>Tirfostinas</u>	75
1.4. Ácidos arilborônicos	79
1.4.1. <u>Ácidos arilborônicos como compostos bioativos</u>	87
1.5. Condensação de Knoevenagel.....	94
2. ESTRATÉGIAS EMPREGADAS	99
3. OBJETIVOS.....	100
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
4.1. Preparo das benzeno-vinilnitrilas por condensação de Knoevenagel	101
4.1.1. <u>Benzeno-vinilnitrilas sem o boro (64a-f)</u>	103
4.1.2. <u>Benzeno-vinilnitrilas contendo a porção borono (ácidos borônicos, 65a-d)</u>	110
4.2. Estudos <i>in silico</i> direcionados para proteínas quinases	135
4.2.1. <u>Quimiogenômica</u>	135
4.2.2. <u>Docking molecular</u>	136
4.3. Testes biológicos.....	137
4.3.1. <u>Análise de toxicidade em células primárias de mamífero</u>	137
4.3.2. <u>Análise de atividade antiparasitária <i>in vitro</i></u>	142
4.3.3. <u>Avaliação <i>in vitro</i> da atividade inibitória do receptor P2X7 (P2X7R) pelas tirfostinas preparadas</u>	147
4.3.4. <u>Teste de solubilidade, estabilidade microsossomal e permeabilidade <i>in vitro</i></u>	153

4.3.5.	<u>Docking</u> molecular com foco no Receptor P2X7	154
4.3.6.	<u>Estudo ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade)</u> 157	
4.3.7.	<u>Avaliação <i>in vivo</i> da atividade anti-inflamatória dos compostos 65a e 65c</u>	159
5.	CONCLUSÕES.....	160
6.	METODOLOGIA	163
6.1.	Materiais e Métodos	163
6.2.	Técnicas empregadas	164
6.2.1	<u>Espectroscopia na região do infravermelho</u>	164
6.2.2.	<u>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear</u>	164
6.2.3.	<u>Difração de Raios-X</u>	165
6.3.	Procedimento geral para obtenção de benzeno-vinilnitrilas (tirfostinas) através da reação de Knoevenagel com aldeídos comerciais	165
6.3.1.	<u>Utilizando a malononitrila como metileno ativo</u>	165
6.4.	Obtenção de benzeno-vinilnitrilas contendo uma porção borono (borono-tirfostinas) através da reação de Knoevenagel com aldeídos de ácidos borônicos comerciais	201
6.4.1.	<u>Utilizando a malononitrila como metileno ativo</u>	201
6.4.2.	<u>Utilizando o cianoacetato de etila como metileno ativo</u>	214
6.5.	Avaliação biológica e <i>in silico</i>	228
6.5.1.	<u>Cultura de células</u>	228
6.5.1.1.	Macrófagos peritoneais.....	228
6.5.1.2.	Cultura dos protozoários	228
6.5.2.	<u>Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos</u>	229
6.5.2.1.	Ensaio de viabilidade celular pela técnica da redução da resazurina	229
6.5.2.2.	Ensaio de toxicidade celular <i>in vitro</i> por meio da técnica de liberação da Lactato Desidrogenase (LDH).....	229
6.5.3.	<u>Ensaio de permeabilização celular com corantes</u>	230
6.5.3.1.	Captação de iodeto de propídeo (PI)	230
6.5.3.2.	Captação de brometo de etídeo.....	230
6.5.4.	<u>Determinação de ação tripanocida</u>	231
6.5.5.	<u>Ensaio ELISA para detecção de IL-1β</u>	231
6.5.6.	<u>Ensaio <i>in vitro</i> de farmacocinética e biodisponibilidade</u>	231
6.5.6.1.	Cultura de células Caco-2 e tratamento.....	231
6.5.6.2.	Teste de solubilidade dependente de pH.....	232
6.5.6.3.	Avaliação da estabilidade microssomal de fígado	232
6.5.7.	<u>Experimentos <i>in silico</i></u>	233
6.5.7.1.	Ensaio das propriedades ADMET	233
6.5.7.2.	<u>Docking</u> molecular	233
6.5.8.	<u>Análise do edema de pata <i>in vivo</i></u>	233
7.	REFERÊNCIAS	235
	APÊNDICE A.....	260
	APÊNDICE B.....	266
	APÊNDICE C	276

1. INTRODUÇÃO

1.1. Inflamação

A inflamação é um processo natural do corpo que visa proteger a integridade física do organismo. É um mecanismo homeostático,^a uma reação do sistema imune a um estímulo danoso.¹ Este processo altamente regulado protege o organismo não só de corpos estranhos (inflamação infecciosa: bactérias, vírus, protozoários, entre outros), como também de estímulos que não envolvem agentes microbianos (inflamação estéril: agentes químicos, traumas, entre outros). Portanto, a resposta inflamatória é a primeira linha de defesa do corpo, sendo vital para manutenção da saúde do indivíduo. Dependendo do estímulo e da resposta do organismo, a inflamação pode ser considerada aguda ou crônica.¹

Na **tabela 1**, têm-se as principais características que diferenciam os dois processos inflamatórios, como por exemplo, o agente causador, as células envolvidas no processo e o tempo de duração. Normalmente, durante a resposta inflamatória aguda, mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios atuam eficientemente de forma a minimizar danos e infecções, contribuindo para a restauração tecidual e homeostase.¹ Entretanto, quando estes eventos se desenvolvem de forma inadequada, desregulada, a inflamação aguda pode se tornar uma inflamação crônica, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças inflamatórias crônicas (**Tabela 1**) (artrite e asma, por exemplo) e de outras enfermidades (câncer e diabetes) (**Figura 1**). Nesses casos, faz-se necessário o uso de fármacos anti-inflamatórios para controlar a síntese de mediadores e cessar a resposta inflamatória que se tornou prejudicial.²

^a **Mecansimo homeostático**: Processo de regulação através do qual o organismo se mantém em equilíbrio.

Tabela 1 - Diferenças entre o processo inflamatório agudo e o crônico

	Inflamação aguda	Inflamação crônica
Agente causador	Patógenos; radiação ionizante; agentes químicos; trauma mecânico	Persistência do estímulo inflamatório inicial, autoimunidade
Células envolvidas na resposta ao agente causador	Neutrófilos; monócitos; Macrófagos; mastócitos	Macrófagos; linfócitos; fibroblastos
Resposta	Imediata	Tardia
Duração	Poucos dias	Meses ou anos
Evolução	Cicatrização; formação de abscesso; cronificação	Destruição tecidual e fibrose

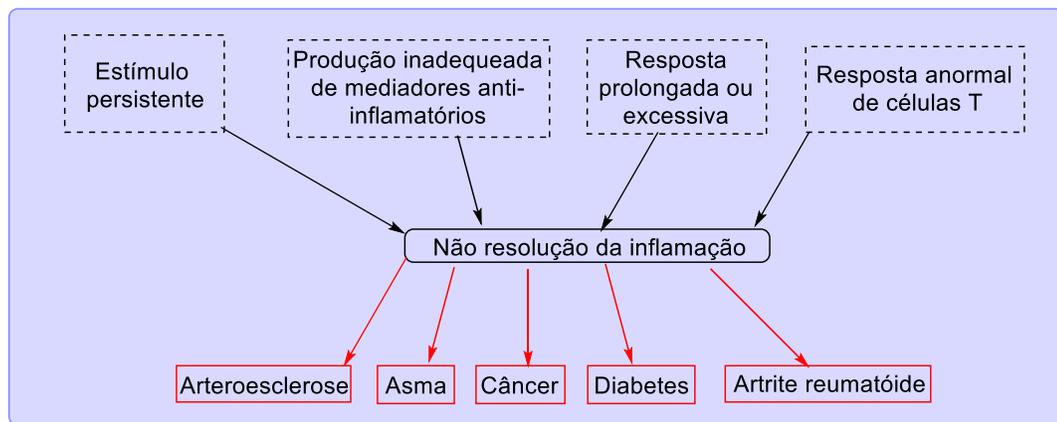


Figura 1 - Causas e consequências da falha da resolução da inflamação²

De forma geral, a inflamação consiste em 4 componentes: o agente danoso que pode ser microbiano ou não, os sensores e os mediadores, que serão abordados posteriormente e por fim, o tecido alvo (**Figura 2**).

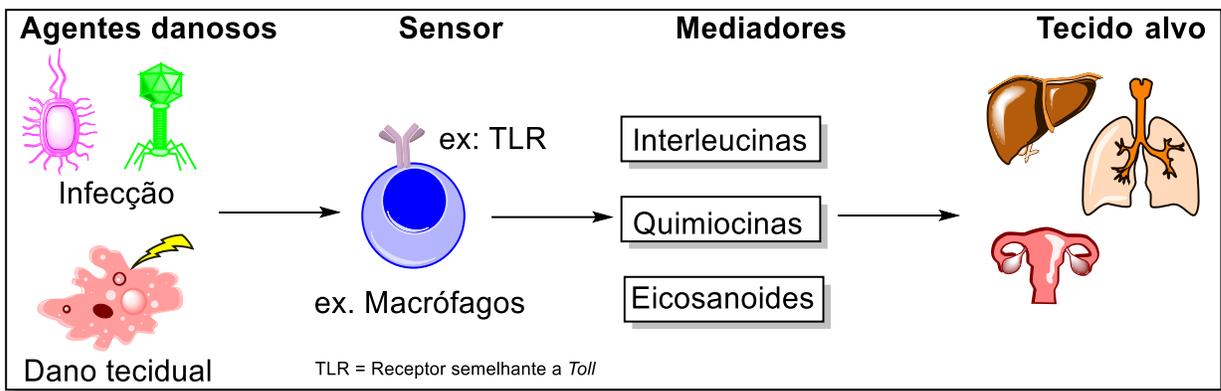


Figura 2 - Exemplos de componentes da inflamação¹

Apesar da resposta inflamatória variar de acordo com o estímulo, é possível resumir o processo em 4 etapas. 1) Reconhecimento do estímulo danoso por receptores presentes na superfície celular; 2) Ativação de rotas inflamatórias; 3) Liberação de mediadores; 4) Recrutamento de células do sistema imune. Os mediadores de inflamação atuam em conjunto nas diferentes fases inflamatórias (vascular, celular e de resolução), induzindo modificações morfológicas e funcionais.³ Inicialmente, no fluxo sanguíneo normal, os leucócitos e eritrócitos encontram-se na coluna axial centralizada, envoltos por uma zona periférica de plasma (**Figura 3 A**). Entretanto, durante a fase vascular da inflamação, ocorrem algumas modificações nesse fluxo normal, tais como liberação de mediadores vasoativos que causam vasodilatação com consequente redução da velocidade de escoamento e aumento do fluxo sanguíneo (hiperemia). Além disso, ocorre a contração das células endoteliais, aumentando a permeabilidade da parede dos vasos e permitindo o extravasamento de plasma. Essas modificações geram os sinais que caracterizam a resposta inflamatória: rubor, calor, edema e dor (**Figura 3 B**).³ A hiperemia é responsável pelos sinais de rubor e calor e o extravasamento de plasma produz o edema e dor. Na fase celular da inflamação, a redução da velocidade de escoamento permite a marginação das células à parede dos vasos sanguíneos. Essa aproximação, possibilita que células do sistema imune fiquem aderidas à superfície das células epiteliais através da expressão de moléculas de adesão tais como selectinas e integrinas (**Figura 3 C**). Nessa mesma fase, ocorre a liberação de mediadores quimiotáticos, capazes de atrair um número maior de células do sistema imune.³ O

gradiente de substâncias quimiotáticas no local inflamado, possibilita a diapedese^b. A migração dos leucócitos dos vasos sanguíneos para o tecido danificado ou infeccionado gera um acúmulo dessas células no local da inflamação. Uma vez nos tecidos, as células fazem fagocitose^c do patógeno^d.⁴ Após a neutralização do agente danoso, ocorre a fase de resolução. Nessa etapa, diversos mecanismos regulatórios (ex.: citocinas anti-inflamatórias e fatores de transcrição) são ativados com o objetivo de diminuir o influxo de neutrófilos^e e reverter a acumulação de leucócitos nos locais inflamados. A etapa de resolução é crucial para prevenir efeitos colaterais provenientes de um estado inflamatório prolongado.⁵

^b **Diapedese**: passagem dos leucócitos do sangue para o tecido conjuntivo

^c **Fagocitose**: processo pelo qual uma célula usa sua membrana plasmática para englobar partículas sólidas

^d **Patógeno**: organismos que são capazes de causar doença em um hospedeiro

^e **Neutrófilos**: células sanguíneas leucocitárias, que fazem parte do sistema imunológico, sendo um dos principais tipos de leucócitos

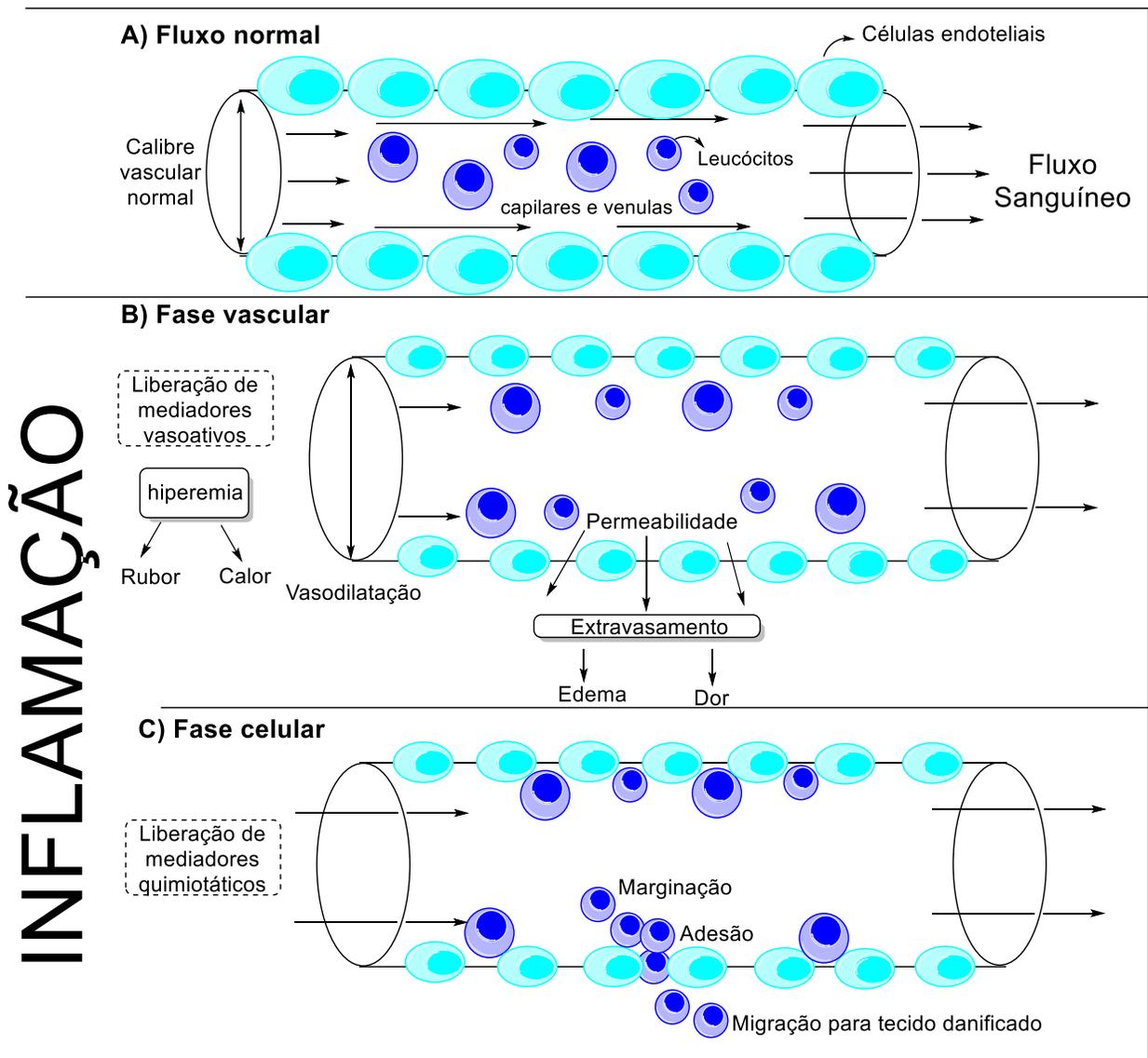


Figura 3 - Fase vascular e celular do processo inflamatório⁴

Os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), presentes nas células do hospedeiro, são ativados ao reconhecer um estímulo danoso. Esse estímulo danoso pode ser gerado por dois grupos de estruturas moleculares, as estruturas comuns entre patógenos e as moléculas sinalizadoras de perigo.⁶ As estruturas moleculares comuns entre patógenos são denominadas **PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos**, os quais podem ser lipossacarídeos da parede celular de bactérias e fungos, resíduos de manose, flagelina ou ácidos teicoicos. Os PRRs reconhecem essas estruturas como corpo estranho, uma vez que elas são conservadas apenas nos agentes

patogênicos, mas não nas células do hospedeiro.⁶ Dentre os receptores que podem ser ativados pelos PAMPs, podem ser citados os receptores semelhantes a *Toll* (TLRs), receptores *scavenger*, receptores semelhantes a RIG, entre outros.^{5,7}

Além de reconhecerem os PAMPs, os PRRs também reconhecem as moléculas sinalizadoras de perigo, também denominadas de **DAMPs - padrões moleculares associados a danos**. Os DAMPs são biomoléculas do hospedeiro presentes no meio intracelular, tais como nucleotídeos (adenosina trifosfato = ATP, difosfato de uridila = UDP ou adenosina difosfato = ADP). Somente quando liberadas no meio extracelular por células danificadas, ativam os receptores (ex.: receptores purinérgicos), o que induz à resposta inflamatória. Apesar desta divisão, alguns receptores como os semelhantes a *Toll*, podem tanto ser ativados por fatores endógenos (DAMPs) como por PAMPs.⁸

A ativação dos PRRs, dependendo do tipo celular, pode gerar diretamente a liberação de mediadores pró-inflamatórios primários. Não obstante, pode também ativar outras rotas inflamatórias que induzem à liberação de mediadores inflamatórios posteriores, contribuindo no processo de inflamação (iniciação, manutenção e resolução).⁸

O controle da resposta inflamatória depende de diversos mediadores; alguns são específicos de um determinado tipo celular e outros são mais gerais. Estes mediadores são oriundos do sistema vascular, das células inflamatórias e dos tecidos danificados.⁹ Podem ser citados os eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos); aminas vasoativas (histamina e serotonina); fator de ativação plaquetária; citocinas pró-inflamatórias (interleucina: IL-1, IL-8, etc; fator de necrose tumoral: TNF- α); quimiocinas (CXCL-1, CXCL2). Dentre esses, as citocinas^f e as prostaglandinas^g são fundamentais na regulação do processo inflamatório. Dessa forma, a habilidade de modular a produção e sinalização destes mediadores é de extrema relevância no desenvolvimento de tratamentos de patologias relacionadas à inflamação.⁹

^f **Citocinas:** polipeptídeos ou glicoproteínas capazes de modular a resposta celular de diversas células.

^g **Prostaglandinas:** são lipídios sinalizadores tais como os hormônios, porém, as prostaglandinas, não entram na corrente sanguínea.

Algumas rotas inflamatórias passíveis de modulação serão descritas. São estas: liberação de prostaglandinas *via* ativação de ciclooxigenases; liberação de interleucina *via* receptor P2X7 e liberação de mediadores *via* proteínas quinase.

1.1.1. Ciclooxigenases

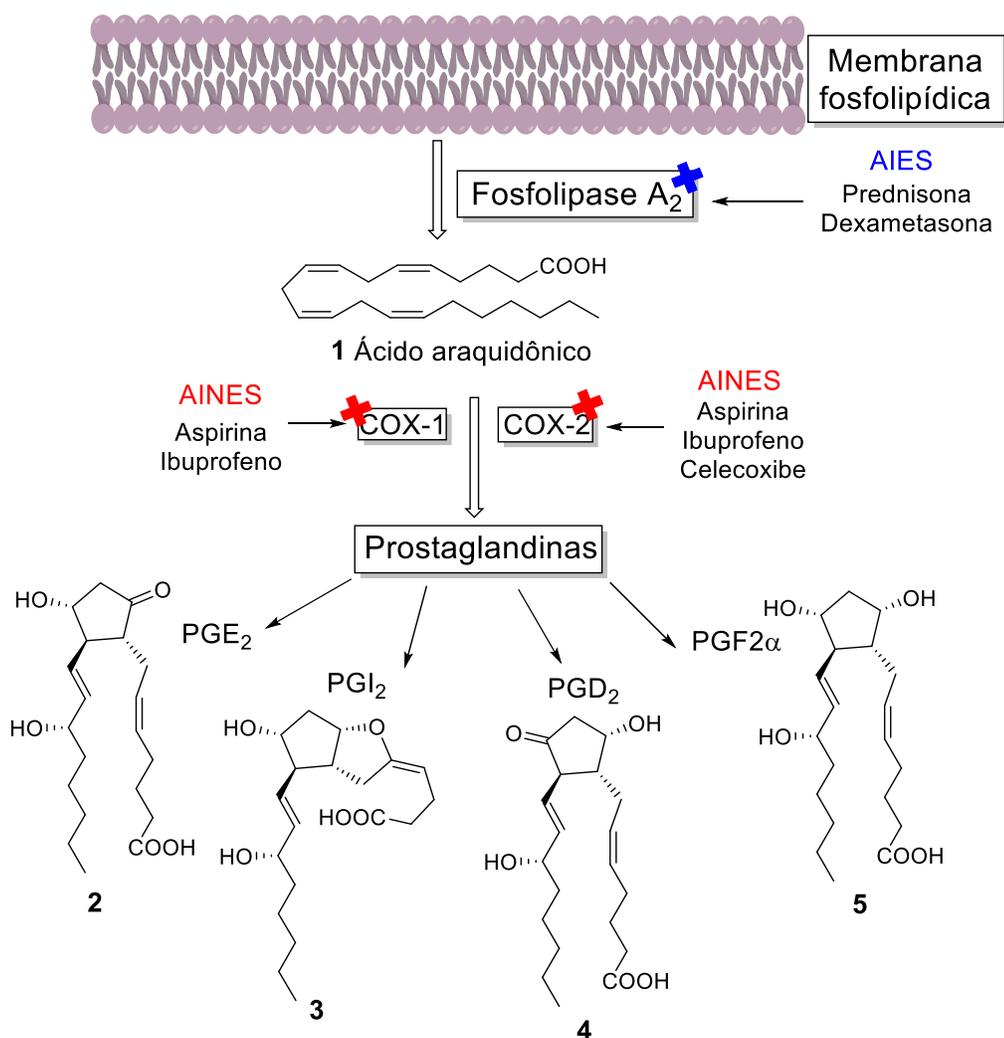
A rota de inibição das enzimas ciclooxigenases é a mais conhecida e estudada até hoje. Para a modulação desta rota, utilizam-se amplamente os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) e os esteroidais (AIES). Estas enzimas são responsáveis pela produção de prostaglandinas.¹⁰ Sua produção se inicia quando o ácido araquidônico **1** (AA, ácido graxo de 20 carbonos), proveniente da bicamada fosfolipídica da membrana celular, é liberado no plasma por ação da enzima fosfolipase A2. A fosfolipase A2 pode ser ativada por diversos estímulos fisiológicos, farmacológicos e patológicos. Em seguida, o AA é metabolizado pelas ciclooxigenases, produzindo a prostaglandina PGH₂ (substrato em comum) que após sofrer biotransformações^h (enzimas e sintetases), gera diferentes prostaglandinas, onde o perfil dos prostanóidesⁱ depende do tipo celular (**Esquema 1**).¹⁰

No processo inflamatório, há 4 prostaglandinas bioativas principais: prostaglandina E₂ (**2**, PGE₂); prostaciclina (**3**, PGI₂); prostaglandina D₂ (**4**, PGD₂) e prostaglandina F_{2α} (**5**, PGF_{2α}). Durante a resposta inflamatória, estes mediadores são sintetizados em maior quantidade. A PGE₂ é a prostaglandina mais abundante no corpo e está envolvida em diversos processos fisiológicos (ex.: pressão arterial e fertilidade). Durante a resposta inflamatória, a PGE₂ participa de todos os processos que levam à formação dos sinais clássicos de inflamação: rubor, calor, edema e dor.¹¹ A PGI₂ é produzida majoritariamente por células vasculares, sendo crucial no processo de homeostase cardiovascular. Essa prostaglandina atua tanto na vasodilatação como na inibição da agregação plaquetária.

^h **Biotransformações:** transformações na estrutura química de um composto mediada por agentes biológicos, como enzimas e sintetases.

ⁱ **Prostanóides:** são uma subclasse dos eicosanoides composta das prostaglandinas, prostaciclina e por tramboxanos.

Além disso, a PGI₂ é um importante mediador no processo de formação de edema e de dor.¹² A PGD₂ é sintetizada tanto no sistema nervoso central (SNC) como no periférico, possuindo função pró ou anti-inflamatória e homeostática. Esta prostaglandina promove a eosinofilia e a migração de células T, estando envolvida no processo de formação da inflamação alérgica.¹³ Por fim, a PGF_{2α} é capaz de induzir a produção de quimiocinas e citocinas.¹⁴



Esquema 1 - Via de síntese de algumas prostaglandinas e alvo molecular dos AINES e AIES¹⁰

A síntese destes hormônios locais depende diretamente da ação das enzimas ciclooxigenases (COXs). As COXs existem, predominantemente, em duas isoformas^j, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é uma enzima constitutiva^k presente na maioria dos tipos celulares. Os prostanóides liberados por ocasião da ação da COX-1 possuem suas funções que podem variar de acordo com os locais onde são liberados. No endotélio, por exemplo, apresentam função anti-trombogênica,^l enquanto que quando liberados na mucosa gástrica levam à produção de muco protetor.¹⁵ Já a COX-2 é induzida por estímulos inflamatórios, hormônios ou fator de crescimento.¹⁶ Essa isoforma da ciclooxigenase é a principal fonte de prostaglandinas em inflamação e doenças proliferativas como câncer.¹⁷

Em decorrência da estreita relação entre as prostaglandinas sintetizadas pela COX e diversos processos que contribuem para o desenvolvimento da inflamação, as ciclooxigenases e a fosfolipase A2 são os principais alvos moleculares dos anti-inflamatórios no mercado (**Esquema 1**). Os chamados AINES e os AIES são anti-inflamatórios amplamente conhecidos. Eles atuam inibindo a síntese de prostanóides, por mecanismos distintos. Entretanto, seu uso indiscriminado está associado a uma série de efeitos colaterais.¹⁸

A) AINES

O primeiro AINE (anti-inflamatório não-esteroidal) a ser sintetizado foi o ácido acetilsalicílico (**6**), em 1899. Ele foi introduzido como medicamento no mercado com o nome de Aspirina[®] pela Bayer.¹⁹ Entretanto, apenas na década de 70, foi descoberto o mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico, o qual inibe a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas através da inibição da COX-1 e/ou COX-2 (**Esquema 1**).²⁰ Desde então, foram sintetizados diversos inibidores de COX-1 e 2. Apesar da

^j **Isoformas**: formas distintas de uma proteína.

^k **Enzima constitutiva**: enzima cuja síntese não depende da presença de substrato específico.

^l **Função anti-trombogênica**: impede que o sangue coagule.

diversidade de suas estruturas, os AINES possuem as mesmas propriedades terapêuticas, mitigando os sintomas da inflamação (rubor, dor, calor e edema). São amplamente utilizados para controlar a febre (efeito antipirético) e diminuir dor de cabeça (efeito analgésico). Os principais grupos de AINES empregados como anti-inflamatórios são os derivados de ácido salicílico (ex.: aspirina **6** e diflunisal **7**), os derivados de ácido acético (ex.: diclofenaco **8** e sunlidaco **9**) e os derivados do ácido propiônico (ex.: ibuprofeno **10** e naproxeno **11**) (**Figura 4**).²¹

Apesar da COX-2 ser a enzima que está mais envolvida com o processo inflamatório, a maioria dos AINES tradicionais inibem irreversivelmente as duas isoformas das ciclooxigenases, possuindo um índice de seletividade maior para inibir a COX-1 (que também possui função constitutiva) do que a COX-2. Portanto, a utilização destes anti-inflamatórios por períodos prolongados está associada a diversos efeitos colaterais. Efeitos adversos incluem toxicidade gastrointestinal, podendo levar ao aparecimento de úlceras, insuficiência renal e hepática e desordens hematológicas e alérgicas.²²

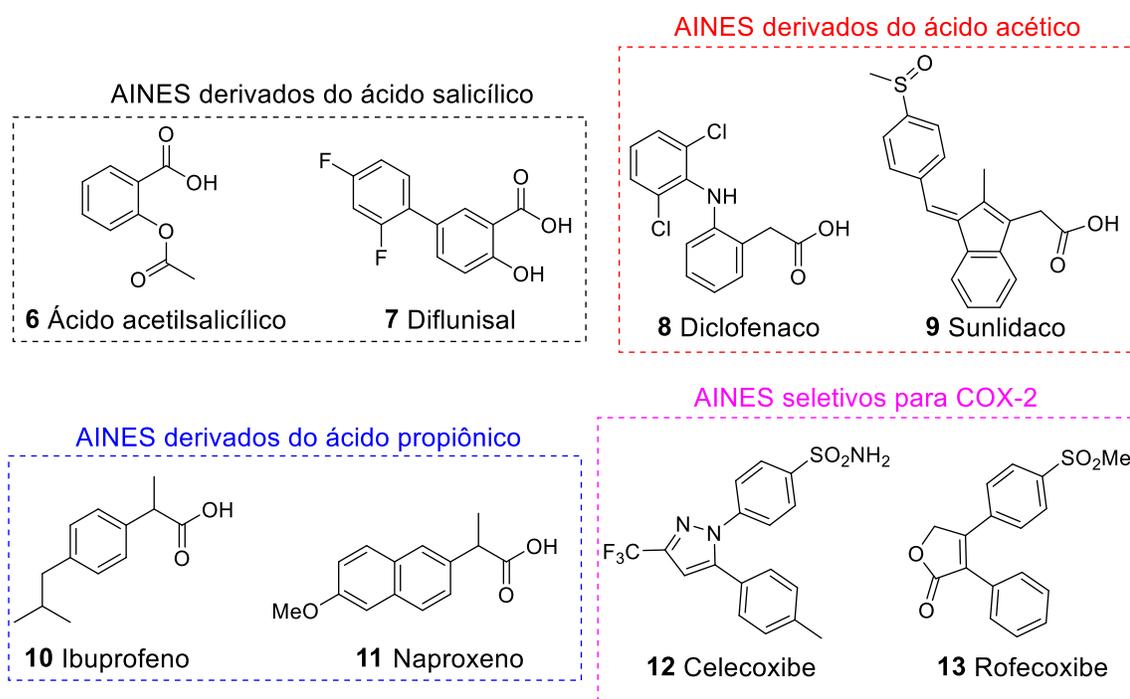


Figura 4 - Estrutura química de alguns AINES

Novos AINES como o celecoxibe **12** e o rofecoxibe **13** foram lançados no mercado com a promessa de, por serem de 325 a 800 vezes mais seletivos para a COX-2, apresentarem menos efeitos colaterais (**Figura 4**). No caso do rofecoxibe, após um grande sucesso de vendas, com arrecadação que excedeu 1 bilhão de dólares em 15 meses, outros efeitos colaterais foram observados. Após novos estudos, foi constatado que a inibição do COX-2 alterava o equilíbrio natural entre o tromboxano pró-trombótico A_2 e a prostaglandina anti-trombótica PGI_2 , o que aumenta significativamente a probabilidade de trombose e outros eventos cardiovasculares.²³ Esta descoberta culminou na retirada do rofecoxibe (Vioxx®) do mercado mundial.²⁴ O celecoxibe entretanto, permanece no mercado.

B) AIES

Os corticosteroides, também chamados de glicocorticoides (GC) ou esteroides são hormônios liberados pelas glândulas endócrinas com o objetivo de regular diversos processos fisiológicos fundamentais. Contribuem na regulação do crescimento de órgãos e proliferação celular, mudanças na adolescência, resposta inflamatória, reprodução, entre outros.²⁵ Dentre os liberados pelo corpo, o cortisol **14** (**Figura 5**) (hidrocortisona) é o principal, sendo liberado apenas quando necessário, como em situações de estresse, durante cirurgias, queimaduras, infecções, etc. Os GC podem modular diversos fatores de transcrição ao se ligarem a receptores de GC (GCR), inibindo a transcrição de diversos mediadores inflamatórios. Desta forma, a expressão de um gene pode ser ativada (ex.: produção de anexina-1) ou suprimida (ex: inibição da produção de ciclooxigenase-2) de acordo com o sinal hormonal.²⁶ A interferência, gênica ou não, do GC em algumas vias importantes leva à supressão da liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios. Como exemplo, tem-se a supressão da atividade do NF- κ B, que faz com que a síntese de citocinas como a IL-6, IL-2 e TNF α seja reduzida. Já a indução e ativação da proteína anexina-1 leva à inibição da enzima fosfolipase A_2 , responsável pela transformação de fosfolípidios em ácido araquidônico, o qual é o substrato das ciclooxigenases na síntese do ácido araquidônico (**Esquema 1**).²⁷

Assim, os glicocorticoides atuam no processo inflamatório de diferentes maneiras, justificando sua eficácia. No contexto da produção de prostaglandinas, os GC exercem sua atividade anti-inflamatória de duas formas: impedem a produção do substrato primário das prostaglandinas, o ácido araquidônico, e inibem a transcrição gênica da COX-2. Existe também na literatura alguns relatos de que os corticoides podem atuar diretamente sobre o DNA, funcionando como um fator de transcrição.²⁸

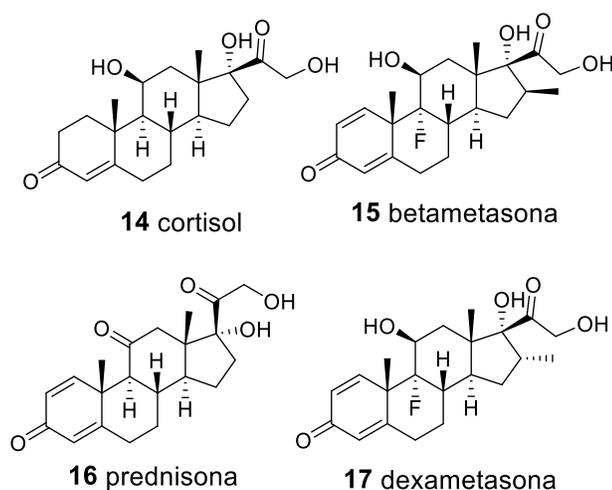


Figura 5 - Estrutura química de alguns glicocorticoides naturais (**14**) e sintéticos (**15**, **16** e **17**)

Em razão do papel crucial dos glicocorticoides nas vias de inflamação, em especial o cortisol, essas moléculas foram utilizadas por diversas indústrias farmacêuticas como protótipos no desenvolvimento de análogos sintéticos tais como a betametasona **15**, prednisona **16** e a dexametasona **17** que mimetizam a ação do cortisol (**Figura 5**).²⁹ Como dito anteriormente, a eficácia destes compostos está associada, majoritariamente, à sua habilidade de reduzir a expressão de diversos mediadores inflamatórios ao atuar sobre os fatores de transcrição.^m Apesar de sua notável eficácia no tratamento de diversas doenças inflamatórias crônicas como asma, artrite reumatoide, doenças

^m **Fatores de transcrição:** proteínas que controlam a taxa de transcrição genética do DNA para o RNA mensageiro ao se ligar a uma sequência específica de DNA.

inflamatórias intestinais, entre outras, o uso terapêutico de glicocorticoides é limitado.³⁰ Isso porque o tratamento prolongado com glicocorticoides pode resultar no desenvolvimento de resistência e dependência e,³¹ na maioria dos casos, pode acarretar efeitos colaterais severos, tais como a síndrome de Cushing,ⁿ imunossupressão, osteoporose, etc. (**Tabela 2**).³²

Tabela 2 - Efeitos colaterais comuns devido ao uso prolongado ou altas concentrações de GC

Sistema	Efeito colateral
Sistema musculoesquelético	Necrose de ossos, osteoporose, atrofia muscular
Sistema reprodutivo	Retardamento da puberdade e do crescimento fetal, hipogonadismo
Sistema cardiovascular	Hipertensão, trombose
Sistema imunológico	Imunossupressão, reativação de vírus latente
Sistema endócrino	Síndrome de Cushing, atrofia adrenal, hiperglicemia

Apesar de sua eficiência no tratamento de doenças inflamatórias e na mitigação dos sintomas da inflamação, as classes de anti-inflamatórios AINES e AIES apresentam profundas limitações, especialmente nos casos de tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Nestes casos, a necessidade da utilização prolongada destes medicamentos maximiza os efeitos colaterais, colocando em risco o paciente. Diante deste cenário, é de fundamental importância o desenvolvimento de alternativas mais seguras às terapias anti-inflamatórias vigentes. Dentre as alternativas que vêm sendo buscadas e que estão presentes na literatura, no presente trabalho, dar-se-á enfoque à inibição da liberação de

ⁿ **Síndrome de Cushing:** distúrbios hormonais causados por exposição prolongada a níveis elevados de glicocorticoides.

interleucinas pelo antagonismo do receptor P2X7 e da inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios pela inibição da transcrição gênica ativada por proteínas quinases.

1.1.2. A liberação de interleucina-1 β via NLP3/P2X7R

As interleucinas fazem parte de uma família de moduladores de inflamação chamada citocina. As citocinas participam tanto da inflamação aguda como da crônica, tendo um papel complexo e muitas vezes conflitante (pró e anti-inflamatório), variando de acordo com o tipo e localização celular. Dentre as citocinas importantes no processo inflamatório incluem-se as interleucinas-1 (IL-1 α e IL-1 β), IL-6 e o fator de crescimento tumoral (TNF α).³³ Dentre esses, a IL-1 β , produzida principalmente em macrófagos, destaca-se devido a sua função central na mediação dos processos inflamatórios, como: indução de febre,³⁴ indução da transcrição de outras substâncias pró-inflamatórias³⁵ e diferenciação^o e expansão de células T,³⁶ além de sua associação com o desenvolvimento de patologias^{p37} como, por exemplo as autoinflamatórias.³⁸ A secreção da interleucina-1 β está intimamente ligada à ativação de inflamassomas. Inflamassomas são complexos multiproteicos capazes de mediar o processo de ativação de caspases^q pró-inflamatórias, como a caspase-1, por exemplo. Dentre os inflamassomas conhecidos, o NLRP3 é o mais estudado em razão de sua participação no desenvolvimento de doenças inflamatórias.³⁹ Sua ativação depende de diversos fatores, incluindo o efluxo de potássio e influxo de sódio.⁴⁰ Portanto, a ativação de poros capazes de transportar potássio, como receptor P2X7R e o Kir 6.1, por exemplo⁴¹ leva à montagem do NLRP3 e, conseqüentemente, à ativação da caspase-1. A caspase-1, ao ser ativada, gera a clivagem da pro-IL-1 β , precursora da IL-1 β . Dentro deste contexto, o receptor P2X7

^o **Diferenciação celular:** processo que todas as células vivas passam para especializar-se em determinada função.

^p **Patologias:** alterações da ordem estrutural, bioquímica e funcional em células, tecidos e órgãos que podem ocasionar uma determinada doença.

^q **Caspases:** classe de enzimas que decompõe outras proteínas.

funciona como iniciador do processo de liberação de IL-1 β e portanto, é um alvo molecular promissor para o desenvolvimento de fármacos com ação anti-inflamatória. Existem diversas revisões disponíveis que discorrem sobre o importante papel do P2X7 e de sua família de receptores purinérgicos na inflamação.⁴² Em uma seção separada, serão abordados diferentes aspectos relacionados aos receptores purinérgicos do tipo do receptor P2X7R, tais como a classificação, a estrutura e o funcionamento.

1.1.3. Liberação de mediadores inflamatórios via proteína quinase

A ativação de receptores por PAMPs ou DAMPs desencadeia diferentes rotas intracelulares importantes para a produção de mediadores inflamatórios. Algumas rotas, como as já descritas aqui, não envolvem mudanças na expressão gênica, diferentemente daquelas envolvendo algumas proteínas quinases. Algumas das rotas intracelulares que são ativadas pelos PRRs incluem a MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno = *mitogen-activated protein kinase*), NF- κ B (Fator nuclear Kappa B = Nuclear factor kappa b); JAK (Janus quinase = Janus kinase)-STAT (Transdutor de sinal e ativador da transcrição = *Signal transducer and activator of transcription*) e a Src (Sarcoma).⁴³ Algumas destas rotas envolvem a ativação de proteínas quinases, dentre estas, a JAK-STAT e a Src são, mais especificamente, denominadas tirosinas quinases, as quais fosforilam apenas os resíduos de tirosina presente nos substratos.

As tirosinas são importantes para inflamação por dois motivos: são componentes importantes na cascata de sinalização iniciada pelo PRRs, sendo, portanto, cruciais na produção de citocinas e adicionalmente, muitas das citocinas como o TNF, IL-6 e IL-10 utilizam tirosinas quinases em suas próprias rotas de sinalização. Com isso, as tirosinas são importantes não só na produção de citocinas, mas também em seu funcionamento.⁴⁴ Para ilustrar a ativação de vias inflamatórias que envolvem ação de tirosinas quinases, será abordado o processo de ativação da JAK. Essa é uma proteína associada a um receptor, a qual, ao ser ativada, promove a fosforilação de resíduos específicos de tirosina do receptor do qual faz parte. A fosforilação do receptor proporciona sítios de ligação para as **STAT - proteínas dos sinais transdutores e ativadores de transcrição**. Após o recrutamento e ligação dessa proteína aos resíduos de tirosina

fosforilados no receptor, o STAT é fosforilado pela JAK. Em seguida, o STAT ativado dimeriza e é transportado para o núcleo, onde atua como fator de transcrição (**Figura 6**).⁴⁵ Esta tirosina quinase pode ser ativada pela IL-6, que utiliza a cascata de sinalização promovida pela JAK para produzir citocinas, incluindo a própria interleucina-6.⁴⁶

Com este cenário em mente, a constatação de que alguns inibidores de tirosina quinase (chamados de tirfostinas) são capazes de impedir a produção de alguns tipos de citocinas,⁴⁷ tem chamado a atenção da comunidade científica, o que impulsionou o desenvolvimento de diversos inibidores de tirosina para o tratamento de doenças inflamatórias como a dermatite.⁴⁸ Em uma seção à parte será abordada a importância e o funcionamento das proteínas quinases mais a fundo e, mais especificamente das tirosinas quinases e seus inibidores (tirfostinas). Devido ao crescente interesse por rotas de regulação inflamatória alternativas, estudamos a ação biológica de inibidores derivados de tirfostinas tendo como alvo molecular o P2X7R e a tirosina quinase.

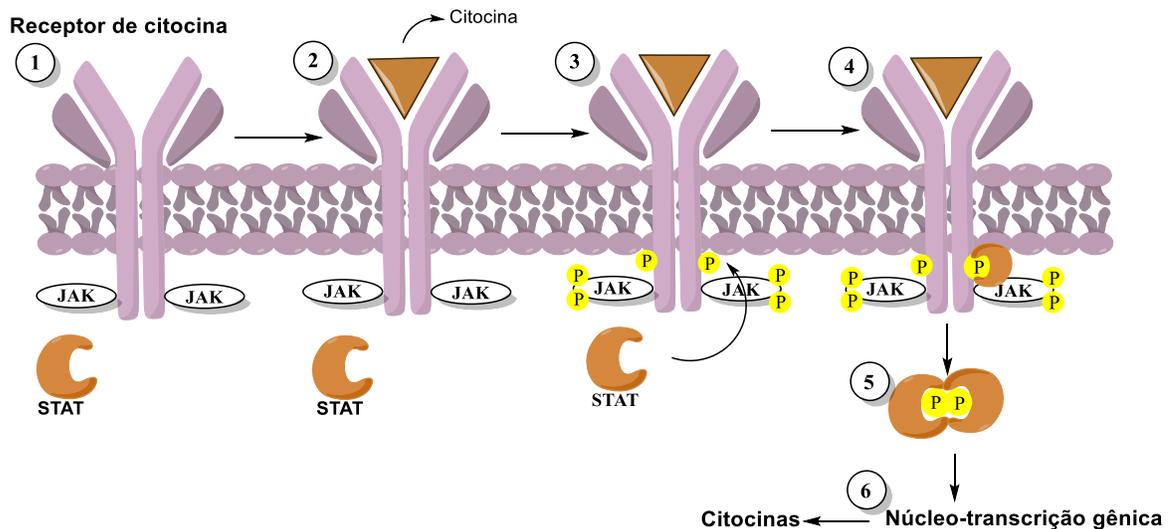


Figura 6 - Ativação da rota JAK-STAT e produção de citocinas. **1.** Receptor inativado; **2.** Ativação do receptor por citocina; **3.** Fosforilação do receptor pela JAK e recrutamento do STAT; **4.** Ligação do STAT no sítio fosforilado do receptor e fosforilação do STAT; **5.** Dimerização do STAT e transporte ao núcleo; **6.** Interação com o DNA para regular transcrição gênica e produzir de citocinas

A inflamação é um sintoma há muito conhecido de doenças infecciosas. Entretanto, estudos mais recentes indicam que a inflamação também é um componente importante em muitas doenças não infecciosas.⁴⁹ Como já mencionado, a inflamação aguda é considerada benéfica na maioria dos casos. Entretanto, em alguns casos de infecção, por exemplo, microrganismos utilizam-se da resposta inflamatória para reproduzirem-se e potencializar sua colonização. Em outros casos, quando a resposta inflamatória é persistente e é incapaz de eliminar o patógeno, a inflamação crônica instaura-se. Dessa forma, surgem as doenças inflamatórias crônicas e diversas outras patologias são fomentadas. Tendo em vista a dualidade do processo inflamatório (benéfico/maléfico) e sua importância no desenvolvimento de patologias tais como: câncer, diabetes, doenças degenerativas, protozooses, arteroesclerose e doenças inflamatórias crônicas, muitas das pesquisas atuais visam combater e modular o componente inflamatório com o objetivo de impedir ou sanar essas doenças.⁴⁹ Nas seções a seguir, serão abordadas algumas das doenças cujos alvos moleculares foram foco do presente trabalho: as doenças inflamatórias crônicas, o câncer e a Doença de Chagas. Essas doenças estão relacionadas a processos inflamatórios.

1.1.4. Doenças inflamatórias crônicas

As doenças inflamatórias crônicas constituem um universo abrangente de doenças, isso porque, podem afetar qualquer órgão do corpo (**Tabela 3**). Apesar destas doenças possuírem fisiopatologias e epidemiologias distintas, a característica em comum entre elas é o desequilíbrio inflamatório. O desequilíbrio pode ser desencadeado por uma infinidade de fatores, tanto antropogênicos^{r,50} quanto relacionados ao hospedeiro (genético, inabilidade de neutralizar ou limpar detritos de microrganismos, mutação, falha na regulação de mediadores anti e pró-inflamatórios, entre outros). Esses fatores

^r **Fatores antropogênicos:** derivados da urbanização e industrialização, como a nutrição, a poluição, o estresse e o sedentarismo.

transformam a inflamação aguda em crônica. Essa última caracteriza-se pela destruição e reparação simultânea dos tecidos. Quando a taxa de destruição excede à de reparação, diversos tipos de doenças inflamatórias, dependendo do tecido afetado, podem ocorrer. Adicionalmente, a presença prolongada de grandes quantidades de mediadores e células inflamatórias por um período prolongado pode desencadear falhas em outros processos fisiológicos como na replicação celular, na angiogênese, na destruição de neurônios e na necrose celular.²

Tabela 3 - Diferentes tipos de doenças inflamatórias crônicas e seu local de inflamação

Doença	Tecido/órgão
Artrite Reumatoide	Conjuntivo
Doença pulmonar obstrutiva crônica	Pulmão
Psoríase	Pele
Esclerose múltipla	Cérebro
Alzheimer	Cérebro
Lupus eritematoso sistêmico	Pele
Doença de Crohn	Intestino
Retocolite ulcerosa	Intestino
Granulomatose de Wegner	Vasos sanguíneos

As doenças inflamatórias crônicas constituem um fardo econômico e social, pois podem incapacitar os indivíduos e requerem tratamentos prolongados, ou até perpétuos. A ocorrência e prevalência populacional (sexo, camada social, país e idade) varia de acordo com o tipo de doença inflamatória. Por exemplo, só em 2017 ocorreram no mundo 1204 novos casos de artrite reumatoide, 7300 de Alzheimer e 4049 de doença inflamatória crônica do intestino.⁵¹ Em um outro estudo, Yang e colaboradores encontraram evidências que apoiam a existência de uma relação entre doenças inflamatórias crônicas e o aumento da mortalidade entre indivíduos socialmente isolados,

levando em consideração a diferença entre gêneros. Ou seja, as doenças inflamatórias crônicas não só reduzem a qualidade de vida do indivíduo, como podem aumentar os riscos de mortalidade.⁵² É possível encontrar evidências substanciais que sustentam a teoria de que pacientes que sofrem de doenças inflamatórias crônicas são mais suscetíveis a apresentar comorbidades^s relacionadas. O aparecimento dessas doenças secundárias além de complicar ainda mais o estado clínico do paciente e reduzir sua expectativa de vida, sobrecarrega ainda mais o sistema de saúde (SUS).⁵³ Por exemplo, pacientes que sofrem com a retocolite ulcerativa por 10 anos têm um aumento do risco em 2% de ter câncer colorretal. Esse risco sobe para 20% após 30 anos de diagnóstico.⁵⁴

A fim de diminuir o sofrimento das pessoas afetadas por doenças inflamatórias crônicas, de melhorar a qualidade de vida das mesmas, bem como reduzir a incidência de doenças mais danosas fomentadas pela instauração do processo inflamatório e reduzir os gastos do sistema de saúde associados à inflamação, faz-se necessário o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios que atuem por vias diversas das que são empregadas na terapia vigente.

1.1.5. Câncer

O câncer é a segunda causa de morte ao redor do mundo, atingindo pessoas de diferentes faixas etárias e sociais todos os anos. Entretanto, a maior parte das mortes, cerca de 70%, ocorre em regiões menos desenvolvidas e entre a população de baixa renda. O número de casos de câncer tem crescido nos últimos anos devido às diversas mudanças no estilo de vida das populações em geral, como obesidade, baixo consumo de vegetais, sedentarismo e uso de cigarro e álcool. Em 2018, foi responsável por 9,6 milhões de mortes e o número de casos deve aumentar em 70% nas próximas duas décadas. Dados da OMS indicam que, até 2020, o câncer será a principal causa de morte em todo mundo. Globalmente, a cada seis mortes uma é causada por câncer.⁵⁵ No Brasil,

^s **Comorbidades:** Co-existência de duas ou mais doenças em um mesmo indivíduo. Em muitos casos, a patologia de uma provoca a outra, podendo também, se potencializar.

segundo o Atlas on-line de mortalidade proporcional não ajustada, cerca de 1,31 milhões de pessoas morreram em 2017 devido a algum tipo de câncer (**Figura 7**). As estimativas do INCA para o biênio de 2018-2019 são de 600 mil novos casos, para cada ano. O câncer de pele não melanoma é o mais incidente entre os brasileiros. Em segundo lugar, tem-se o câncer de próstata para os homens e de mama para as mulheres (**Tabela 4**).⁵⁶



Figura 7 - Gráfico de mortalidade proporcional não ajustada por todas as neoplasias, de homens e mulheres, no Brasil (2014 e 2017)⁵⁷

Tabela 4 - Números estimados para 2018 dos dez tipos de câncer mais incidentes separados por gênero

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Mama feminina	59.700	29,5		Próstata	68.220	31,7
			Mulheres Homens			
Cólon e reto	18.980	9,4		Traqueia, brônquio e pulmão	18.740	8,7
						
Colo do útero	16.370	8,1		Cólon e reto	17.380	8,1
Traqueia, brônquio e pulmão	12.530	6,2		Estômago	13.540	6,3
Glândula tireoide	8.040	4,0		Cavidade oral	11.200	5,2
Estômago	7.750	3,8		Esôfago	8.240	3,8
Corpo do útero	6.600	3,3		Bexiga	6.690	3,1
Ovário	6.150	3,0		Laringe	6.390	3,0
Sistema nervoso central	5.510	2,7		Leucemias	5.940	2,8
Leucemias	4.860	2,4		Sistema nervoso central	5.810	2,7

* Dados para câncer de pele não melanoma não foram apresentados

Câncer é um termo amplo que descreve um conjunto de doenças heterogêneas. Apesar dos diferentes tipos de câncer, um aspecto em comum prevalece: o aparecimento de uma anomalia no processo natural de renovação celular. Essa anomalia provoca o crescimento e a divisão desordenada das células. Em determinadas condições fisiológicas, a desregulação desses processos importantes, pode acarretar no aparecimento de um câncer.⁵⁸ Os fatores que levam o seu desenvolvimento são numerosos e distintos, variando de fatores ambientais como dieta, tabagismo, poluição, compostos químicos, radiação, infecções, entre outros,⁵⁹ a hereditários. Em ambos os casos, ocorre ou existe uma mutação genética, a qual não envolve, necessariamente uma alteração na sequência do DNA. Trata-se, portanto, de uma doença genética.⁶⁰ Origina-se de uma mudança nos genes que controlam o funcionamento das células, principalmente no modo como elas crescem e dividem-se. Os principais tipos de genes afetados são: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumores.

Os proto-oncogenes são genes encarregados de expressar proteínas responsáveis pelo crescimento e divisão celular, entretanto, quando estes genes estão alterados ou superativados, transformam-se em oncogenes. A mutação permite o aumento desenfreado da divisão celular (**Figura 8**), redução na diferenciação celular e inibição da morte celular. Logo, os oncogenes e as proteínas expressadas por eles são alvos moleculares importantes no tratamento de câncer (**Tabela 5**).⁶¹

A tirosina quinase é responsável por cerca de um terço dos oncogenes ligados à ocorrência de câncer em humanos.⁶²

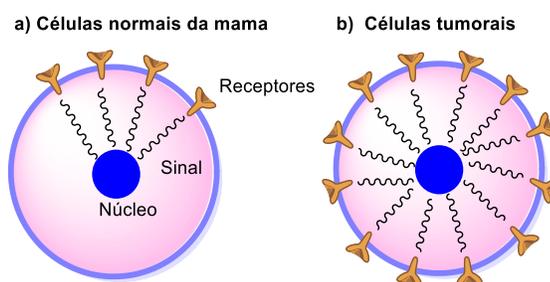
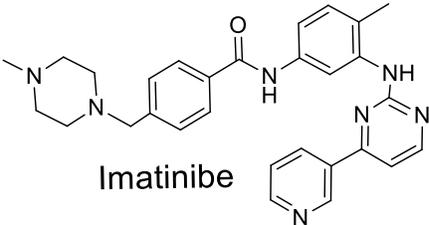
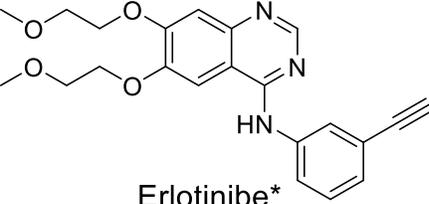


Figura 8 - Sinalização em células normais versus células tumorais. A) Quantidade normal de receptores HER-2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2*) que enviam sinais para a célula se dividir; B) Quantidade anormal de receptores HER-2 (tirosina quinase) que enviam um excesso de sinais para a célula se dividir

Tabela 5 - Oncogenes como alvos moleculares no tratamento de câncer⁶³

Alvo	Tipo de câncer	Tratamento	
		Anticorpos	Fármacos não-biológicos
HER-2+	Mama	Trastuzumabe*	-
BCR/ABL	Leucemia mieloide crônica	-	 <p>Imatinibe</p>
C-KIT	Tumor estromal gastrointestinal	-	Imatinibe
EGFR	Colorretal	Cetuximabe*	-
EGFR	Pâncreas	-	 <p>Erlotinibe*</p>
VEGF	Fígado, mama, colorretal	Bevacizumabe*	-

* Tratamento é feito com uma combinação de agentes citotóxicos

Já os genes supressores de tumores são responsáveis por reduzir a divisão celular, reparar erros no DNA e induzir morte celular (apoptose ou morte celular programada). Ou seja, funcionam como um controle negativo de proliferação celular. Desse modo, a inativação desses genes pode levar ao desenvolvimento do câncer.⁶⁴ Portanto, no caso dos proto-oncogenes sua ativação culmina no desenvolvimento do câncer; enquanto que no segundo caso, esse efeito é produzido pela desativação dos genes supressores. Em muitos casos, proteínas supressoras de tumor inibem a mesma rota regulatória que é estimulada pelo oncogene.

O desenvolvimento do câncer é um processo de acúmulo de mutações e envolve múltiplas etapas que não são completamente conhecidas. Entretanto, sabe-se que tanto

a ativação do oncogenes como a desativação de genes supressores de tumores são etapas necessárias para a iniciação e progressão do tumor.⁶⁵

Muitos dos fatores ambientais mencionados como causas para o desenvolvimento do câncer promovem uma resposta inflamatória ou a instauração de uma inflamação crônica. Esse quadro inflamatório pode ser responsável pela característica carcinogênica de muitos destes fatores. Diferentes tipos e mecanismos de inflamação podem promover o desenvolvimento e a progressão do câncer, assim como auxiliar no processo anti-câncer (**Figura 9**). Por exemplo, a exposição prolongada por fatores ambientais irritantes ou obesidade podem resultar em inflamação crônica que promove mutações e angiogênese.⁶⁶ Da mesma forma, a inflamação crônica associada com infecções ou doenças autoimunes promove o desenvolvimento do tumor induzindo mutações oncogênicas e angiogênese. Entretanto, nem toda inflamação crônica aumenta o risco de câncer, em alguns casos, como no caso da psoríase pode haver uma redução.⁶⁷

A inflamação induzida por tumor está intimamente ligada com o desenvolvimento do tumor, uma vez que a resposta inflamatória promove a progressão do tumor, a metástase^t e a imunossupressão local. As terapias anticâncer podem também promover uma resposta inflamatória ao causar trauma e necrose, estimulando o reaparecimento do câncer e resistência a terapia. Entretanto, em alguns casos inflamação induzida por tratamento e a inflamação induzida por tumor podem aumentar a apresentação de antígenos levando a uma erradicação das células tumorais (**Figura 9**).⁶⁸ Estima-se que a inflamação ou infecção promovem cerca de 25% dos casos de câncer, uma vez que células imunológicas são capazes de regular todos os estágios do desenvolvimento do câncer.⁶⁹

^t **Metástase**: implantação de um foco tumoral à distância do tumor original.

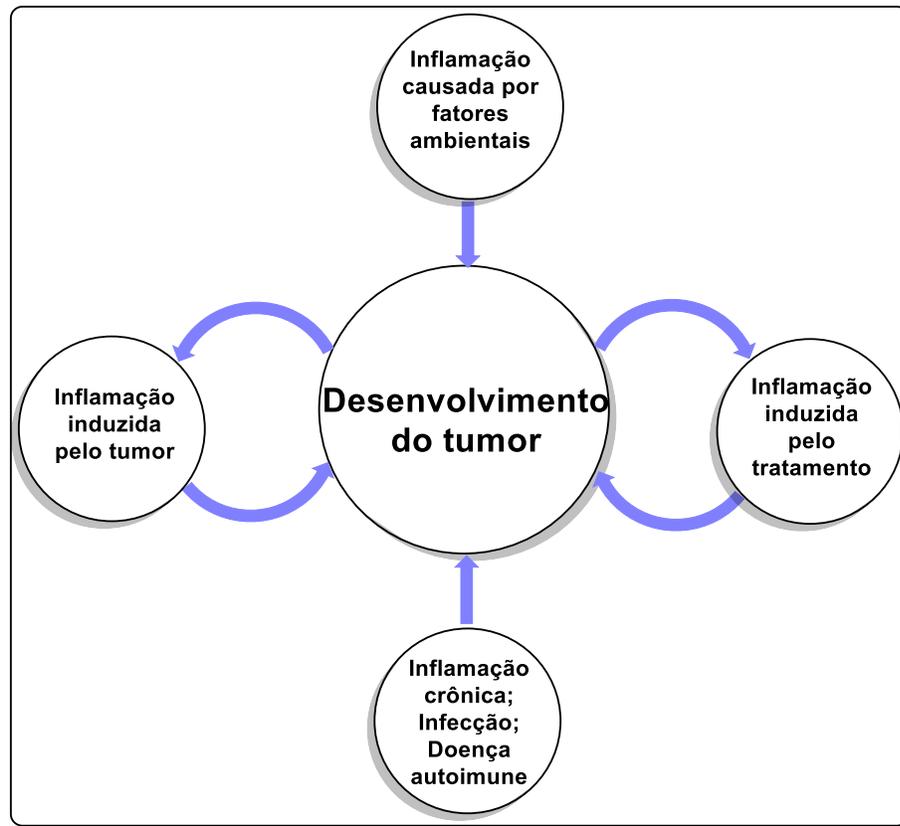


Figura 9 - Correlações entre inflamação e câncer⁶⁸

As células imunológicas afetam as células malignas através da produção de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, gerando consequências em todas as etapas da tumorigênese^u. Por exemplo, na etapa de iniciação do tumor a inflamação pode contribuir através da mutação, instabilidade genômica e modificações epigenéticas^v; durante a etapa de progressão do tumor, a inflamação ativa respostas para reparação de tecido, induz a proliferação de células pré-malignas e aumenta sua sobrevivência. Além disso, a inflamação promove angiogênese, pode estar relacionada ao mecanismo da imunossupressão localizada para

^u **Tumorigênese:** processo pelo qual as células normais são transformadas em células cancerígenas.

^v **Mudanças epigenéticas:** mudanças genéticas herdáveis que não alteram sequência de DNA.

reduzir a resposta do sistema imune do paciente às células cancerígenas e promoção da migração e implantação das células metastáticas.⁷⁰

Assim como a inflamação poder ser percussora do câncer, ela pode também ser promovida pelo câncer. Muitas das massas malignas iniciam um processo inflamatório, promovendo um microambiente com mediadores inflamatórios. A presença de mediadores atrai mais células inflamatórias para o local. Essas células liberam mais mediadores que ajudam no crescimento da massa, promovendo a evolução do câncer. Dessa forma, um ciclo vicioso é iniciado onde o câncer promove a inflamação e a inflamação promove o câncer.⁷¹

Em outros casos, a resposta inflamatória pode ser iniciada pelo tratamento. Quimioterapia e a radioterapia causam a morte de muitas células cancerígenas e saudáveis. A presença de células mortas ativa uma resposta inflamatória que pode ser benéfica, fomentando uma resposta imune antitumoral, ou promover o crescimento do tumor.

Em resumo, o papel da inflamação no desenvolvimento do câncer é complexo e muitas vezes contraditório. Em alguns casos tem ação pró-câncer e em outros, anti-câncer. Em vista da íntima correlação entre inflamação e câncer, a modulação dos mecanismos inflamatórios é uma estratégia interessante para prevenir e tratar o câncer.⁷²

Algumas rotas inflamatórias citadas aqui são especialmente interessantes, como a rota que envolve o receptor P2X7 e a rota que envolve tirosinas quinases. O receptor P2X7 possui um papel ambíguo. O P2X7R expresso em células dendríticas ajuda na apresentação de antígenos tumorais aos linfócitos T, promovendo sua diferenciação. Antagonicamente, o P2X7R pode estimular a angiogênese^w quando ativado pelo ATP liberado pelo tumor.⁷³

A tirosina quinase pode ser considerada um alvo com dupla ação, pois além de estar envolvida na progressão da inflamação, esta proteína está envolvida na regulação do processo de divisão e proliferação celular.⁷⁴

^w **Angiogênese:** mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes.

Apenas 2018, o investimento do Ministério da Saúde em ações para o controle e tratamento do câncer foi de cerca de R\$ 3,8 bilhões de reais (**Tabela 6**).⁷⁵ Portanto, o tratamento desta doença apresenta um elevado custo para o sistema de saúde brasileiro e, como os dados mostram, a tendência é aumentar. Além disso, os fármacos disponíveis no mercado para o tratamento do câncer são extremamente agressivos às células benignas, passíveis de formação de resistência e são custosos. Tendo em vista esse cenário, faz-se necessária a implantação de políticas de prevenção capazes de reduzir os gastos com o tratamento dessa doença. Em paralelo, novos fármacos que tenham menos efeitos colaterais (mais seletivos), mais eficientes e acessíveis para terapia, devem ser desenvolvidos.

Tabela 6 - Estimativa de gastos federais com serviços oncológicos nos anos de 1999, 2009 e 2018⁷⁶

Tipo de serviço	1999	2009	2017
Cirurgia oncológica	R\$ 87 milhões	R\$ 172,81 milhões	R\$ 929 milhões
Radioterapia	R\$ 77 milhões	R\$ 163,72 milhões	R\$ 453 milhões
Quimioterapia	R\$ 306 milhões	R\$ 1.228,41 milhões	R\$ 2,474 bilhões
Iodoterapia	R\$ 0,048 milhão	R\$ 4,15 milhões	R\$ 4,62 milhões
Total	R\$ 470,5 milhões	R\$ 1,6 bilhão	R\$ 3,86 bilhões

1.1.6. Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também chamada de tripanossomíase americana ou esquistotripanose é uma enfermidade ocasionada pela infecção humana pelo parasita protozoário *Trypanosoma cruzi*. A principal via de transmissão do protozoário é através dos vetores triatomíneos, insetos hematófagos popularmente conhecidos como barbeiros

ou bicudos. Essa antropozoonose^x leva o nome do médico que a descobriu, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas.⁷⁷

Considerada endêmica em 20 países da América Latina, a Doença de Chagas representa um grande desafio para a saúde pública do país e do mundo, afetando, majoritariamente, uma população economicamente vulnerável e com pouco acesso ao sistema de saúde. Por esse e outros motivos, a tripanossomíase americana faz parte de um conjunto de 19 doenças denominado doenças tropicais negligenciadas.⁷⁸ De acordo com a organização mundial de saúde, este termo refere-se a doenças como malária, doença do sono, leishmaniose, dengue, entre outras que recebem investimentos reduzidos em pesquisa para o desenvolvimento de tratamentos e meios de prevenção, apesar de incapacitarem e matarem milhões de pessoas.⁷⁹ Isso porque, são consideradas doenças não-rentáveis para a indústria farmacêutica em razão do perfil populacional afetado.⁸⁰

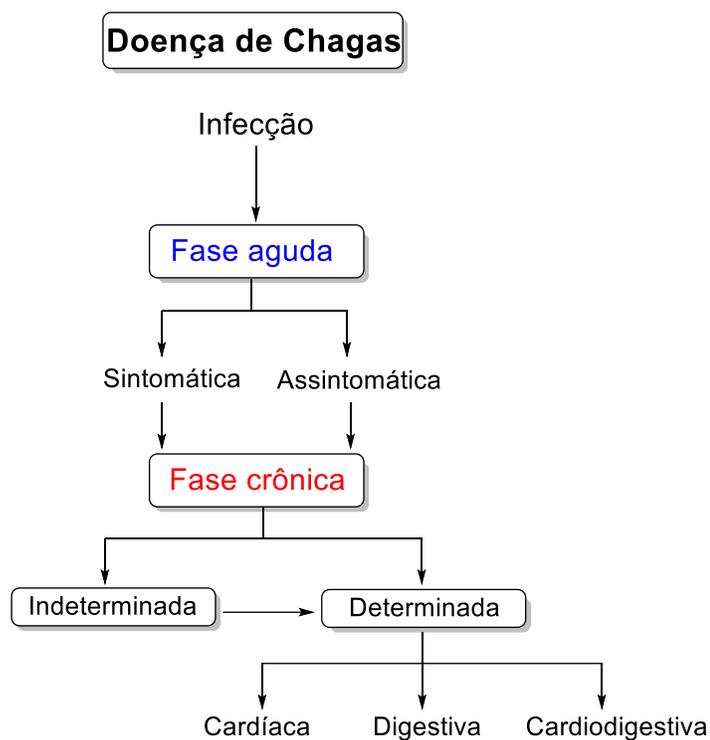
A falta de controle e tratamento tem acarretado epidemias ao redor do globo, não apenas em países endêmicos. Com a globalização e aumento de movimentos migratórios, países que antes não eram afetados (EUA, Canadá e alguns países da Europa) agora sofrem os danos econômicos e sociais causados por essas doenças.⁸¹ Em 2013, o custo relacionado com a Doença de Chagas no mundo foi estimado entre 4-11 bilhões de dólares por ano, incluindo os custos relacionados com perda de produtividade do indivíduo afetado.⁸²

O curso clínico da doença de Chagas é caracterizado por uma fase aguda curta e uma fase crônica, responsável por 90% das mortalidades (**Esquema 2**).⁸³

A fase aguda (fase inicial da infecção), na maioria dos casos, é assintomática e dura em média de 4 - 8 semanas, sendo que a parasitemia reduz, substancialmente, após 90 dias. Os indivíduos sintomáticos podem apresentar os seguintes sintomas na fase aguda: febre persistente, inflamação no local de inoculação (chagoma de inoculação), edema de pálpebra unilateral (sinal de Romana), linfadenopatia (alteração no tamanho dos

^x **Antropozoonose:** doença primária de animais e que pode ser transmitida aos humanos.

linfonodos) e hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e do baço).⁸⁴ Casos severos da fase aguda acontecem em apenas 1-5% dos pacientes e seus sintomas incluem inflamação do miocárdio, da meninge e/ou do cérebro.



Esquema 2 - Fases clínicas e estágios da Doença de Chagas⁸³

Mesmo sem o uso de medicamentos, a fase aguda é resolvida espontaneamente. Após a resolução dessa fase, os indivíduos infectados entram na fase crônica que é dividida em duas formas. A forma indeterminada, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas, ocorre em 60-70% dos infectados, podendo evoluir para a forma determinada da doença após 10-30 anos da infecção inicial.⁸⁵

A forma determinada é caracterizada por manifestações cardíacas e/ou digestivas (**Esquema 2**). A cardiopatia é a manifestação mais comum e mortal da doença, apresentando sintomas tais como: arritmia, dilatação ventricular, tromboembolismo e insuficiência cardíaca.⁸⁶ Um aspecto em comum nas duas fases, aguda e crônica, é o aparecimento de uma intensa resposta inflamatória.

Um dos grandes desafios do controle e tratamento da Doença de Chagas é o diagnóstico. Estima-se que menos de 10% dos infectados recebem o diagnóstico correto.⁸⁷ Por esse motivo, as estimativas de indivíduos infectados são imprecisas e subnotificadas, dificultando o planejamento do combate à doença. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 7-8 milhões de pessoas no mundo tenham esta doença (sintomática ou não), a qual constitui-se na causa de uma média de 12 mil mortes por ano.⁸⁸

Já de acordo com as estimativas da Fiocruz, só nas Américas existem 12 milhões de portadores da doença em seu estágio crônico.⁸⁹ Segundo o ministério de saúde, são estimados entre 1,9 milhões a 4,6 milhões de portadores crônicos no Brasil.⁹⁰ A faixa ampla demonstra a incerteza dos dados, uma vez que apenas os casos agudos são de notificação compulsória e que não há dados sistemáticos relativos à prevalência da doença. Além disso, a fase aguda onde os protozoários estão em maior quantidade e sua detecção laboratorial é mais fácil é, na maioria dos casos, assintomática ou os sintomas são parecidos com doenças virais, dificultando seu diagnóstico correto.⁹¹

Apesar de ainda haver grandes desafios a serem enfrentados, os números de casos da doença em sua forma aguda reduziram drasticamente. Essa redução é em parte consequência de políticas e cuidados com relação a transmissão por sangue como: transfusão de sangue, transplante de órgãos e transmissão congênita (transplacentária).⁹² Vale ressaltar que a transmissão do parasita por sangue é uma forma secundária de transmissão, assim como a transmissão por consumo de comida ou água contaminada (transmissão oral)⁹³ e acidentes laboratoriais⁹⁴ Além disso, políticas de combate ao parasita e a substituição de casas de barro por de alvenaria, reduzindo a proliferação do barbeiro, são outras causas para a redução dos casos da Doença de Chagas.

Acredita-se que a resposta inflamatória é crucial para manter os parasitas em controle. O *T. cruzi*, ao entrar na corrente sanguínea, é reconhecido por células imunológicas residentes,⁹⁵ desencadeando a liberação de substâncias pró-inflamatórias como citocinas e quimiocinas.⁹⁶ Esses compostos iniciam o recrutamento de macrófagos, neutrófilos e células exterminadoras naturais. A posterior invasão e destruição de células pela multiplicação parasitária, aumenta a infiltração celular e consequentemente a

inflamação. Entretanto, o parasita é capaz de modular alguns aspectos da resposta inflamatória a seu favor.⁹⁷ Por exemplo, ao serem fagocitados por macrófagos, os protozoários são capazes de escapar do fagolisossoma para o citoplasma e se replicar.⁹⁸ Também são capazes de interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β).⁹⁹

A ausência ou diminuição da resposta inflamatória acarreta na replicação excessiva do parasita e posteriormente, a morte do hospedeiro. Por outro lado, uma reação imune excessiva leva a danos irreparáveis nos tecidos e conseqüentemente a morte do indivíduo.¹⁰⁰ Logo, deve haver uma regulação minuciosa da resposta inflamatória, permitindo o controle parasitário, sem a destruição tecidual. Nos seres humanos, esse balanço pode ser alcançado. Entretanto, ele é atingido de forma que a eliminação do parasita é impossível. Quando o sistema imunológico consegue controlar a parasitemia, a doença passa de sua fase aguda, para a crônica. Na maioria dos casos, esse controle conduz a doença para a forma indeterminada da fase crônica.¹⁰¹ Todavia, em alguns indivíduos, a forma determinada da doença se instaura como consequência de dois fatores: inflamação crônica gerada pelo parasita e a presença parasitária persistente. Esses dois fatores promovem mecanismos de lesão tecidual progressiva.¹⁰² Portanto, o controle da resposta inflamatória e a modulação da liberação (induzida pelo parasita) de citocinas e quimiocinas é imprescindível para evitar a progressão e mitigar os danos causados pela Doença de Chagas.

Os únicos tratamentos disponíveis para essa doença são os compostos benznidazol **18** (Rochagan[®]) e o nifurtimox **19** (Lampit[®]). Contudo, só o benznidazol é liberado no Brasil (**Figura 10**). Estes compostos estão no mercado há mais de 50 anos e apesar do grande impacto que esta doença tem sobre o sistema de saúde e qualidade de vida da população, nenhum outro composto foi colocado no mercado desde então. Essas terapias estão desatualizadas pois são mais eficazes contra as formas tripomastigota e amastigota durante a fase aguda da doença, sendo que, atualmente, prevalecem os casos crônicos da doença. Além disso, os compostos apresentam alta toxicidade e por isso não podem ser utilizados em grávidas, e requerem tratamentos longos (30-60 dias).¹⁰³ Alguns efeitos colaterais são: vômito, dor abdominal, insônia e neuropatia

periférica, entre outros. Entretanto, esses fármacos ainda são os únicos meios de tratamento tanto na fase aguda, quanto na crônica.¹⁰⁴

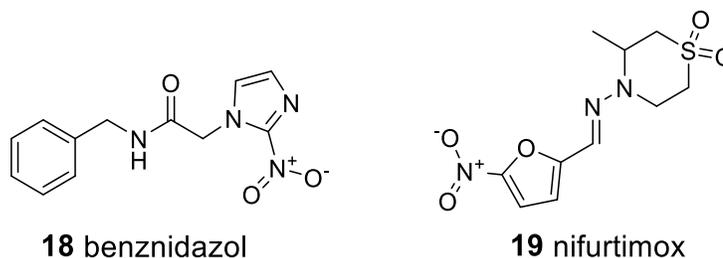


Figura 10 - Estrutura do Benznidazol (**18**) e do Nifurtimox (**19**)

O *T. cruzi* tem um ciclo biológico complexo com diferentes variações morfológicas e funcionais (replicativas, não-replicativas e infectantes). As formas replicativas são: epimastigotas (presente no hospedeiro invertebrado) e amastigotas (presente no hospedeiro vertebrado). A forma não-replicativa é a tripomastigota sanguínea, enquanto que a forma infectante é a tripomastigota metacíclica.

O ciclo inicia-se quando o vetor invertebrado, como o barbeiro, é contaminado ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado, como o ser humano. Na corrente sanguínea desse hospedeiro, encontra-se a forma tripomastigota não-replicativa (**Figura 11**). Durante a fase no hospedeiro invertebrado, a forma tripomastigota se diferencia em epimastigota no intestino médio do inseto hospedeiro.¹⁰⁵ A forma epimastigota é capaz de realizar divisões celulares (forma replicativa), mantendo o inseto infectado. Ao chegar na parte final do intestino, há uma nova diferenciação através de um processo conhecido como metaciclogênese. Nesse processo, a forma epimastigota transforma-se na forma infectante do protozoário o tripomastigota metacíclico, que é liberada pelo inseto através das fezes.¹⁰⁶ A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre apenas quando as fezes contaminadas entram em contato com a mucosa ou ferimentos na pele (ex.: picada do inseto).

Uma vez na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas invadem as células presentes no local de inoculação, como os macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. Essa invasão ocorre em duas etapas: a adesão e a internalização.¹⁰⁷ Substâncias presentes na superfície do parasita se ligam a receptores de membrana

específicos (ex.: tirosina quinase C - TrkC) das células imunológicas do hospedeiro, favorecendo a adesão do invasor. A adesão inicia um processo de sinalização em cascata que culmina na invaginação da membrana plasmática e, posterior internalização do parasita.¹⁰⁸ Em seguida, o protozoário se diferencia na forma amastigota. Essa forma é capaz de se dividir por divisão binária, aumentando o número de parasitas no citoplasma.¹⁰⁹ Após a divisão, as formas amastigotas se diferenciam novamente na forma tripomastigota, sendo liberadas novamente na corrente sanguínea logo após ruptura da célula hospedeira.

Devido à alta motilidade da forma tripomastigota, o protozoário, ao ser liberado pode atingir todos os tecidos do hospedeiro, invadindo outros tipos celulares (**Figura 11**).¹¹⁰

Conhecer o ciclo de vida do parasita, principalmente os mecanismos de invasão e permanência no hospedeiro vertebrado, é crucial para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de eliminar completamente o parasita sem incapacitar ou matar o hospedeiro. Considerando o escopo desse trabalho, a influência da inflamação na progressão da Doença de Chagas e a importância do receptor P2X7 e das tirosinas quinases em diversos processos regulatórios e inflamatórios, daremos um enfoque maior nas vias de modulação que envolvem o P2X7R e tirosinas quinases.

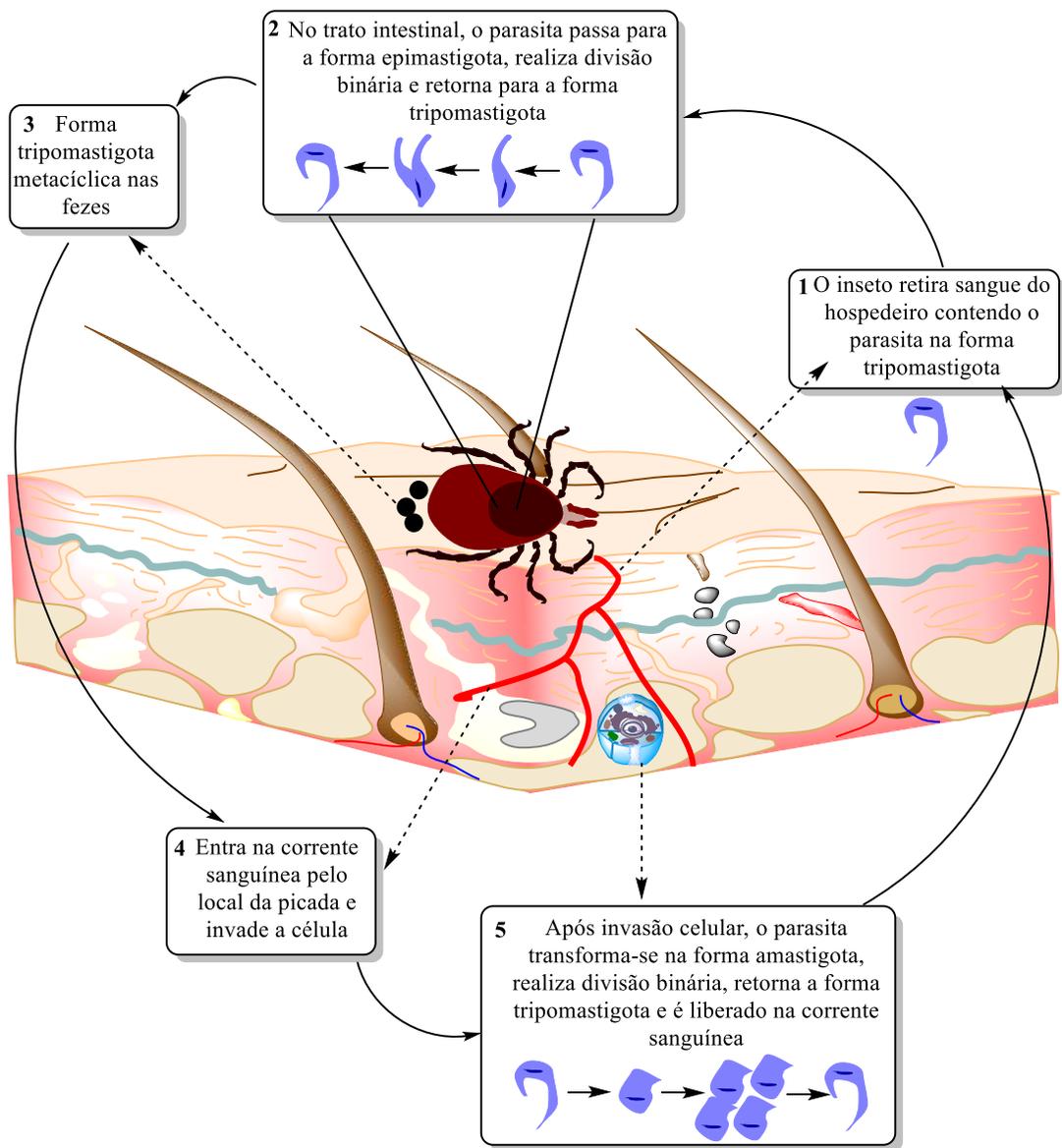


Figura 11 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Como já mencionado, o protozoário *T. cruzi* é capaz de interferir em rotas inflamatórias de forma a favorecer sua proliferação, através da indução da produção de citocinas, por exemplo. Todavia, as formas como esse parasita altera o processo natural ainda não são completamente conhecidas.

O protozoário pode enganar o sistema de defesa do corpo de diferentes formas, como por exemplo, através do reconhecimento e sinalização celular.¹¹¹ O *T. cruzi* libera substâncias que, ao interagirem com receptores de membrana do hospedeiro,

desencadeiam cascatas de sinalização, permitindo a entrada do parasita na célula.¹¹² Essa artimanha é essencial para garantir a sobrevivência e proliferação do *T. cruzi*, uma vez que ele é um parasita intracelular obrigatório. Em razão disso, tirosinas quinases são prováveis alvos moleculares no desenvolvimento de fármacos tripanocidas.¹¹³

Uma revisão realizada por Souza e colaboradores,¹⁰⁸ resume os diferentes tipos de receptores envolvidos no processo de adesão e internalização do protozoário, tais como receptores semelhantes a *Toll* e tirosinas quinases.¹¹⁴

Sabe-se que a forma tripomastigota do *T. cruzi* libera enzimas chamadas de ecto-NTPDases (*Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase*), capazes de hidrolisar ATP extracelular.¹¹⁵ Adicionalmente, os receptores purinérgicos são ativados pela presença de nucleotídeos, como ATP, no meio extracelular. Dessa forma, o parasita pode modular a resposta inflamatória e imune do hospedeiro modificando a concentração de ATP extracelular (molécula considerada sinalizadora de perigo), através da liberação dessas enzimas.

Portanto, os receptores purinérgicos, incluindo o P2X7R, podem ser alvos moleculares promissores, porquanto são peças cruciais na regulação de mediadores pró e anti-inflamatórios.¹¹⁶

1.2. Receptores purinérgicos

Descritos pela primeira vez em 1976 por Burnstock, os receptores purinérgicos de membrana são ativados na presença de nucleotídeos e nucleosídeos. Estas moléculas podem atuar como sinalizadores purinérgicos no meio extracelular.¹¹⁷ Os purinoreceptores são expressos em quase todos os tipos celulares e participam de processos fisiológicos importantes como: secreção exócrina e endócrina, resposta imune, agregação plaquetária, vasodilatação endotelial, cicatrização, proliferação celular, inflamação e secreção de citocinas,¹¹⁸ e, em processos patológicos, tais como: artrite reumatoide, disfunção do trato urinário, esclerose lateral amiotrófica (ELA), diabetes e câncer.¹¹⁹

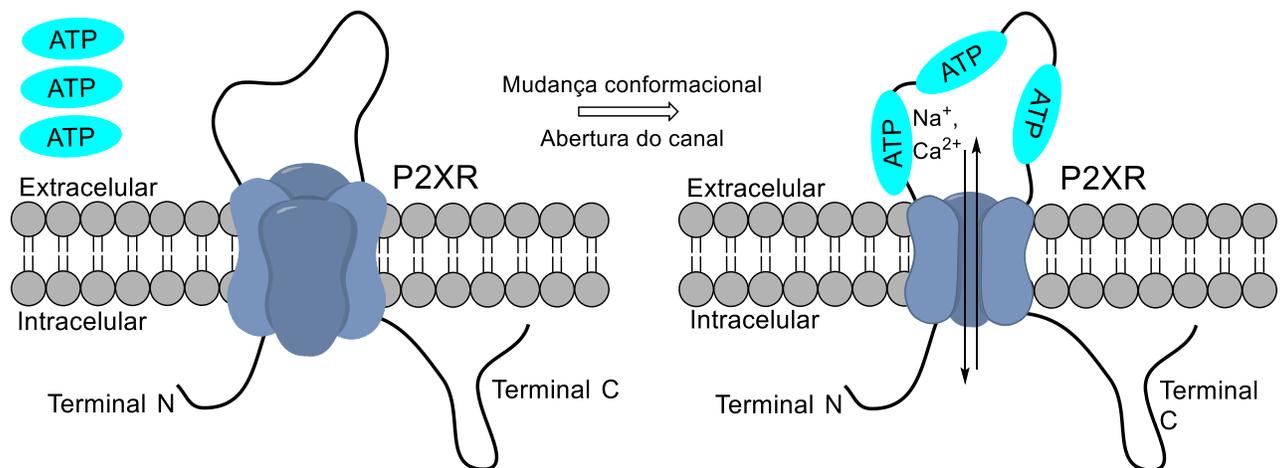
Dois anos depois, os receptores purinérgicos foram divididos em duas famílias: aqueles que têm a adenosina como agonista foram denominados P1 e os que eram

ativados por ATP, ADP e algumas pirimidinas P2. A família P1 tem, atualmente, 4 subtipos de receptores identificados e clonados, são eles: A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃. Todos os membros desta família são chamados de receptores metabotrópicos,^γ ou seja, estão ligados à proteína G.

Já a família P2 é subdividida quanto a sua farmacologia, estrutura molecular e mecanismo de ação em dois grandes grupos P2YR e P2XR. O grupo de receptores P2Y, subdividido em oito subtipos (P2Y_{1R}, P2Y_{2R}, P2Y_{4R}, P2Y_{6R}, P2Y_{11R}, P2Y_{12R}, P2Y_{13R} e P2Y_{14R}), é metabotrópico e pode ser ativado na presença de ATP e outros nucleotídeos como ADP, UTP, UDP e UDP-glicose. Os receptores P2X são ativados apenas por ATP e são descritos sete subtipos (P2X_{1-7R}).¹²⁰

Os P2XR são proteínas de membrana que atuam como canais iônicos, promovendo uma troca não seletiva de cátions (Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺) entre o meio extracelular e o meio intracelular, quando ativados por ATP.¹²¹ O mecanismo de abertura do poro consiste em 3 etapas: ligação do agonista (ATP), a propagação do sinal com seguinte mudança conformacional e a abertura do canal (**Esquema 3**). O receptor, ao interagir com seu agonista, neste caso, com 2 a 3 moléculas de ATP, sofre mudanças alostéricas que se propagam por toda sua estrutura. Como resultado, abre-se um canal seletivo transmembranar que permite a passagem de íons mono e divalentes. Após o processo de ativação, ocorre uma fase lenta de dessensibilização e, por fim, uma fase rápida de decaimento da corrente após a saída do ATP do sítio de ligação.¹²²

^γ **Receptores metabotrópicos:** são uma sub-classe de receptores de membrana que não formam um canal iônico, mas usam mecanismos de transdução de sinal, na maioria dos casos proteínas G, para ativar uma série de eventos intracelulares usando mensageiros químicos secundários.



Esquema 3 - Representação do mecanismo de ativação dos receptores P2X

Alguns P2XR, como P2X2R, P2X4R e o P2X7R, quando ativados por períodos prolongados de exposição e/ou concentração maior de ATP, são capazes de abrir um canal transmembranar permeável às moléculas hidrofílicas entre 314 Da e 900 Da. Já outros P2XR, sobre exposição prolongada de ATP, fecham o canal por consequência da dessensibilização do receptor. O mecanismo detalhado de abertura do poro é descrito por Kawate.^{121, 123}

1.2.1. Receptor P2X7 (P2X7R)

O receptor P2X7 faz parte da família P2X. Ele se diferencia em alguns aspectos dos outros membros desta família. Em termos de sua estrutura, o P2X7R é o membro com maior número de aminoácidos, 595. Este receptor é composto basicamente de um terminal amino citoplasmático (aminoácidos 1-25), constituído de resíduos de aminoácidos relacionados com a seletividade e regulação do canal iônico e¹²⁴ de duas regiões transmembrana altamente hidrofóbicas a TM1 (aminoácidos 26-46) e a TM2 (aminoácidos 335-355). Apresenta também, uma região de *loop* extracelular (aminoácidos 47-334) que é a região de interação com o agonista ATP e de um terminal carboxílico intracelular rico em cisteína (aminoácidos 356-595). Esse terminal é constituído de 239 aminoácidos, o mais longo entre os receptores da família P2X, e está

envolvido na maioria das funções relacionadas ao P2X7R, como ativação de vias de sinalização e interação proteína-proteína.¹²⁵

Outra característica única do P2X7R é sua baixa sensibilidade ao ATP **20** (agonista^z natural), em relação aos outros membros da família. O EC₅₀ (concentração que produz metade do efeito máximo) obtido para o P2X7R em diversos trabalhos se encontra na faixa de 100 µM-2,5 mM, dependendo da espécie.¹²⁶ Um outro agonista conhecido é o composto sintético 2,3-O-(4-benzoilbenzoil)-ATP, o BzATP **21**. Em receptores de camundongo e humano, este ligante é cerca de 10 vezes mais potente que o ligante natural (**Figura 12**). Um aspecto interessante deste receptor é que ele pode ser ativado em 2 estágios. Em concentrações nanomolares de ATP extracelular um canal iônico de baixa condutância seletivo é aberto, permitindo a passagem preferencial de íons mono e divalentes.¹²⁷ Já em concentrações na ordem de submicromolar e milimolar por tempo prolongado, o P2X7R forma um poro (canal iônico de alta condutância) não seletivo de membrana que possibilita a passagem de moléculas até 900 Da, como corantes (Amarelo de Lúficer, Brometo de Etídeo, YO-PRO®).¹²⁸

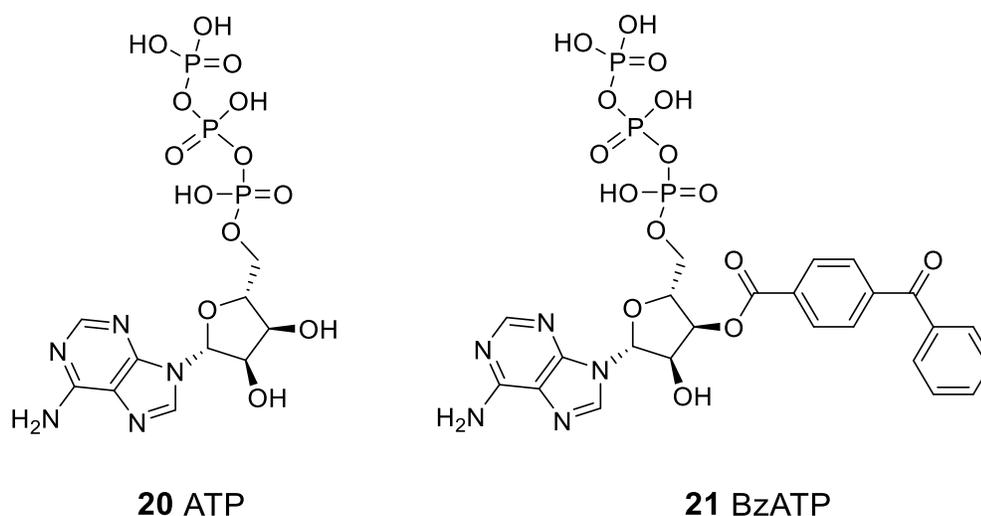


Figura 12 - Agonista natural e sintético do P2X7R

^z **Agonista**: substância capaz de ligar-se a um receptor celular e ativá-lo.

O P2X7R é expresso em variados tipos de celulares, tais como células oculares,¹²⁹ ósseas,¹³⁰ musculares,¹³¹ exócrinas,¹³² entre outras. Entretanto, este receptor é, predominantemente, expresso em células de linhagem hematopoiética (presente em células tanto do sistema imune inato como do adaptativo: macrófagos,¹³³ basófilos, neutrófilos, linfócitos T entre outros.¹³⁴ Como resultado de sua ampla distribuição, o P2X7R está associado a diversos eventos fisiológicos como: proliferação celular,¹³⁵ migração e invasão celular,¹³⁶ morte celular, neurotransmissão¹³⁷ e processos inflamatórios.¹³⁸ Portanto, a desregulação (superexpressão ou superativação) deste receptor está relacionada com diversas patofisiologias, podendo gerar resultados benéficos ou maléficos.

Por estar presente, majoritariamente, em células do sistema imune, o papel que o P2X7R exerce sobre o desenvolvimento e manutenção do processo inflamatório é o mais estudado atualmente. Este interesse é explicado pela importância do processo inflamatório no desenvolvimento de outras patologias tais como, doenças neurodegenerativas, câncer, doenças inflamatórias crônicas, doenças parasitárias, entre outras (**Figura 13**). As funções que o P2X7R exerce sobre estas patologias podem ser encontradas em diversos artigos na literatura.^{119c,139}

A ausência do receptor P2X7 altera o funcionamento imune da célula, como constatado em um estudo realizado por Labasi e seu grupo. Em um modelo de murino com artrite, os animais com deficiência deste receptor, apresentaram redução da incidência e severidade da doença.¹⁴⁰

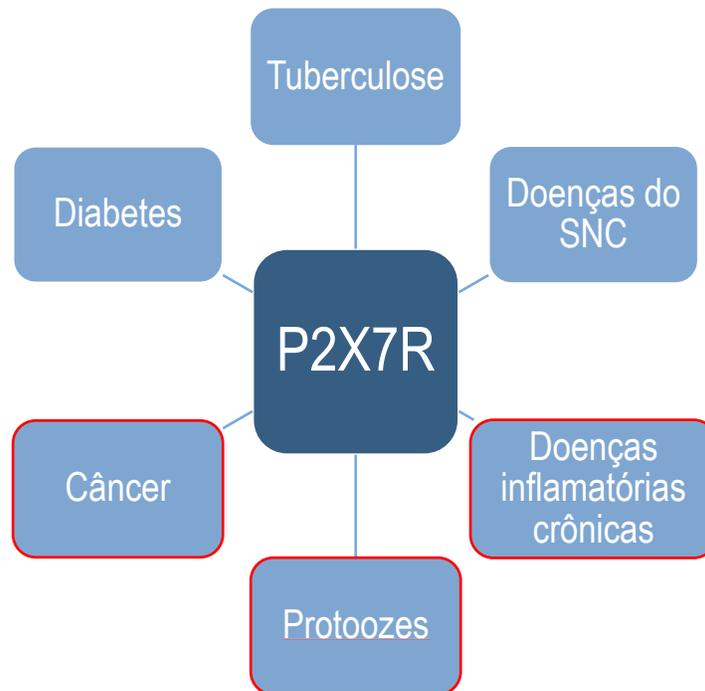


Figura 13 - P2X7R como possível alvo terapêutico para diversas doenças

O ATP extracelular, agonista do P2X7R, é considerado um padrão molecular associado a danos (DAMP). Esta molécula, comumente encontrada no meio intracelular em concentrações na ordem de 5-10 mmol/L, é liberada ao meio extracelular após algum tipo de estresse ou lesão celular, gerando um sinal de alerta. Por isso, ao redor de locais de inflamação, o ATP encontra-se em altas concentrações. Por exemplo, na vizinhança de células danificadas a concentração de ATP extracelular pode chegar a 0,125 - 5 mM.¹⁴¹ Já na microvizinhança de tumores, são encontrados níveis de até 0,700 mM.¹⁴² Uma das teorias do porquê o P2X7R só ser ativado em concentrações mais altas do que os outros membros da família, está relacionada com seu papel crucial na morte celular e processo inflamatório.

Fisiologicamente, a liberação do ATP intracelular para o meio extracelular pode ocorrer a partir de células necróticas, sob estresse ou por danos à membrana plasmática.¹⁴³ Nesses casos, o ATP alcança o meio extracelular devido à ruptura da membrana, o que ocasiona a liberação de uma grande quantidade de nucleotídeos de forma não-específica. A liberação de ATP pode ocorrer também sem lise celular, por

exemplo, quando ocorre exocitose vesicular, através de transportadores de membrana como os transportadores ABC, e por canais iônicos como as pannexinas, possivelmente o P2X7R, entre outros.¹⁴³

Tendo em vista a importância do P2X7R no controle de diversos processos fisiológicos e sua atuação no desenvolvimento de diversas patologias, muitas indústrias farmacêuticas (ex.: Roche, Actelion Pharmaceutica, Pfizer e AstraZeneca) têm empreendido esforços na busca por antagonistas do receptor P2X7R. Uma revisão publicada em 2017 por Park e Kim, reúne patentes de antagonistas^{aa} do P2X7R de 2010 até 2015.¹⁴⁴ Apesar de existirem diversos antagonistas seletivos, com ação *in vitro* e *in vivo*, a maioria destes não possui ação terapêutica efetiva em humanos, os compostos CE-224535 **22** da Pfizer e AZD9056 **23** da AstraZeneca, falharam na fase II e III, respectivamente (**Figura 14**).¹⁴⁵ Apesar do contratempo, inúmeras moléculas de diferentes classes ainda se encontram em fases de desenvolvimento e testes clínicos. Entretanto, não há ainda nenhum antagonista do P2X7R disponível no mercado para ensaios terapêuticos, apenas para testes biológicos pré-clínicos.¹⁴⁶ Sendo assim, o desenvolvimento de novos fármacos que tenham como alvo o P2X7R é de elevada relevância no momento.

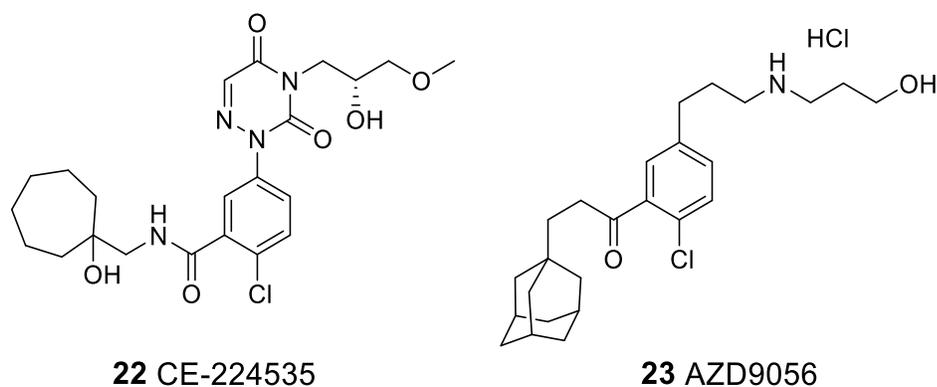


Figura 14 - Estrutura química de antagonistas do P2X7R

^{aa} **Antagonistas:** moléculas que inibem a resposta biológica induzida por um agonista.

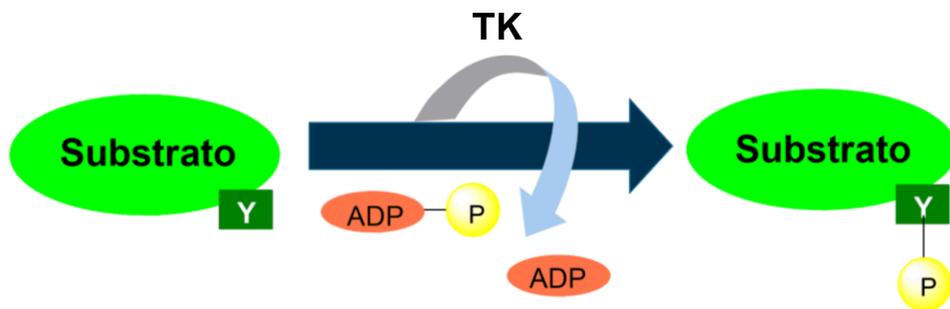
1.3. Tirosina Quinase

As tirosinas quinases (TQ ou TK, do inglês *Tyrosine Kinase*) fazem parte de uma família de enzimas chamadas proteínas quinases (PK, do inglês *Protein Kinase*). Essas enzimas catalisam a transferência de um grupamento fosfato do ATP, para resíduos de aminoácidos presentes em diferentes substratos.¹⁴⁷ A fosforilação^{bb} transforma a estrutura do peptídeo, modificando a função ou atividade da proteína-alvo. É um mecanismo essencial que permite a transmissão de sinais intra e extracelulares através da célula e para o núcleo. Dessa forma, as proteínas quinases medeiam inúmeras cascatas de sinalização, regulando processos fisiológicos cruciais, como: divisão celular,¹⁴⁸ metabolismo,¹⁴⁹ sobrevivência celular,¹⁵⁰ apoptose,¹⁵¹ transcrição,¹⁵² entre outros.

Portanto, a desregulação da fosforilação altera o funcionamento celular. Essas mudanças patológicas dentro da célula podem resultar no aparecimento de doenças,¹⁵³ tais como: câncer,¹⁵⁴ artrite reumatoide¹⁵⁵ e doenças neurodegenerativas.¹⁵⁶ Por isso, as proteínas quinases são consideradas alvos terapêuticos promissores.

Atualmente, são descritas 518 proteínas quinases humanas classificadas de acordo com o aminoácido que é fosforilado. Quando a fosforilação ocorre em resíduos de treonina ou serina, a proteína quinase é chamada de proteína serina-treonina quinase (PSTK em inglês). Já aquelas que fosforilam resíduos de tirosina de substratos (**Esquema 4**) são chamadas de proteína tirosina quinase (PTK em inglês).¹⁵⁷ A tirosina quinase retira um fosfato do ATP, autofosforilando-se. Em seguida, transfere o fosfato para o substrato contendo um resíduo de tirosina (**Esquema 4**)

^{bb} **Fosforilação:** adição de um grupo fosfato (PO₄) a uma proteína ou outra molécula.



Esquema 4 - Fosforilação do resíduo de tirosina (Y) pela tirosina quinase (TK)

As tirosinas quinases ainda podem ser subclassificadas de acordo com sua organização e localização celular em: tirosinas quinases receptoras (RTKs, do inglês *Receptor Tyrosine Kinase*) e tirosinas quinases não-receptoras (NRTKs, do inglês *Non-Receptor Tyrosine Kinase*). Dentre as 90 TKs conhecidas, 58 são RTK, divididas em 19 subfamílias de acordo com o domínio quinase e 32 são do tipo NRTK, divididas em 10 subfamílias (**Tabela 7**).¹⁵⁸

Tabela 7 - Família das tirosinas quinases

Família das tirosinas quinases	
Tirosinas quinases receptoras	Tirosinas quinases não-receptoras
ALK (<i>Anaplastic Lymphoma Kinase</i>); DDR (<i>Discoidin Domain Receptor</i>); EGFR (<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>); EPH (<i>Ephrin Receptor</i>); FGFR (<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>); INSR (<i>Insuline Receptor</i>); MUSK (<i>Muscle-Specific Kinase</i>); PDGFR (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>); PTK7 (<i>Protein Tyrosine Kinase 7</i>); ROR (<i>Receptor Tyrosine Kinase-like Orphan</i> <i>Receptor</i>); RYK (<i>Receptor Like Tyrosine</i> <i>Kinase</i>); TIE (<i>Tyrosine Kinase with</i>	ABL (<i>The Abelson Kinase</i>); ACK (<i>Activated Cdc42 Kinases</i>); CSK (<i>C-</i> <i>terminal SRC Kinases</i>); FAK (<i>Focal</i> <i>Adhesion Kinase</i>); FES (<i>Feline</i> <i>Sarcoma</i>); JAK (<i>Just Another Kinase</i>); SYK (<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>); TEC (<i>Tyrosine Kinase Expressed in</i> <i>Hepatocellular Carcinoma</i>); FRK (<i>Fyn-</i> <i>Related Kinase</i>); SRC

<i>Immunoglobulin-like and EGF-Like Domains</i>); TRK (<i>Tropomyosin Receptor Kinase</i>); VEGFR (<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>); AATYK (<i>Apoptosis-Associated Tyrosine Kinase</i>); RET; ROS; AXL; MET	
---	--

1.3.1. Tirosinas quinases receptoras (RTKs)

As tirosinas quinases receptoras são componentes cruciais de rotas de sinalização celular, realizando a transdução de sinais^{cc} extracelulares para o citoplasma. Mediando assim, a comunicação intercelular e diversos processos biológicos desde do desenvolvimento embrionário até a vida adulta. Apesar de existirem, até o momento, 58 tipos diferentes de tirosinas quinases receptoras humanas, todas compartilham de uma estrutura básica composta de um domínio ligante extracelular (N-Terminal), uma hélice transmembrana e um domínio intracelular (C-Terminal), além das características específicas de cada família (**Figura 15**).¹⁵⁹

O primeiro domínio recebe o sinal de ativação através da interação com um ligante (L), o transmembranar conecta o extracelular com o citoplasmático e o último, possui atividade quinase retirando um fosfato do ATP e fosforilando, seletivamente, resíduos de tirosina de diferentes substratos (**Esquema 4**).

^{cc} **Transdução de sinal:** Conversão de um tipo de sinal ou estímulo (físico ou químico) em um outro, com o objetivo de transferir informações.

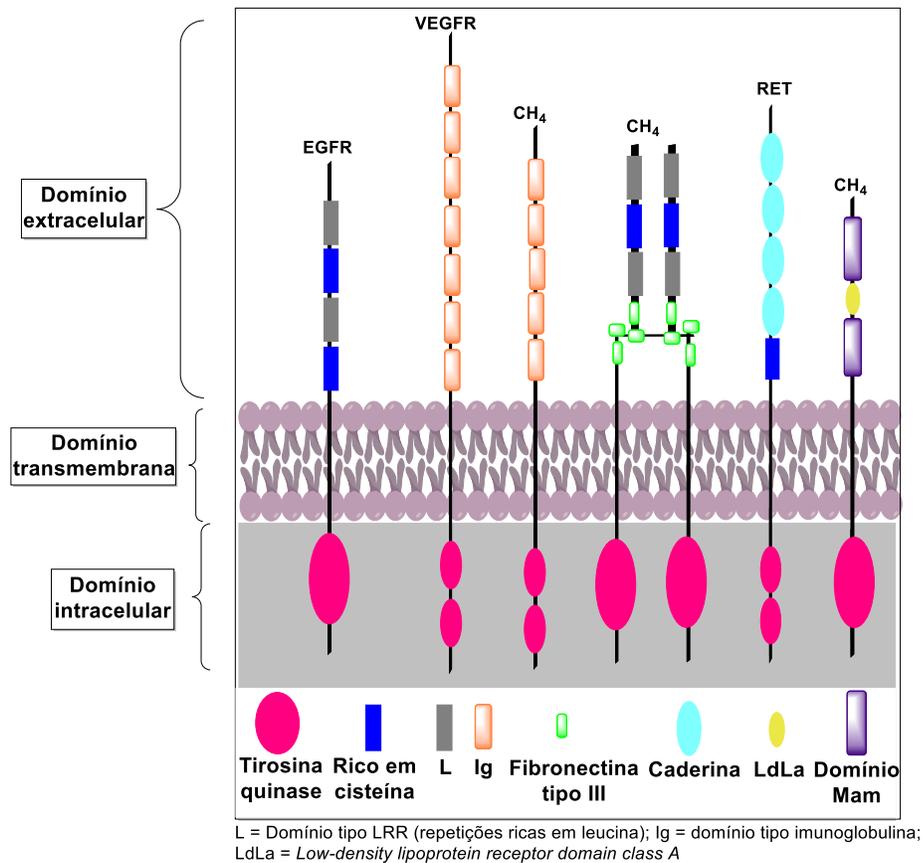


Figura 15 - Estrutura básica dos receptores tirosina quinase e características específicas de algumas famílias¹⁵⁹

As tirosinas quinases receptoras são ativadas quando ligantes específicos interagem com o domínio extracelular. A interação ligante-receptor induz a dimerização ou oligomerização do receptor, ativando-o.¹⁶⁰ A fosforilação da proteína pode, então, ocorrer indiretamente por meio de uma proteína adaptadora (**Figura 16 A1**) ou diretamente (**Figura 16 A2**). A fosforilação da proteína sinalizadora inicia uma cascata de sinalização, gerando uma resposta celular.¹⁶¹

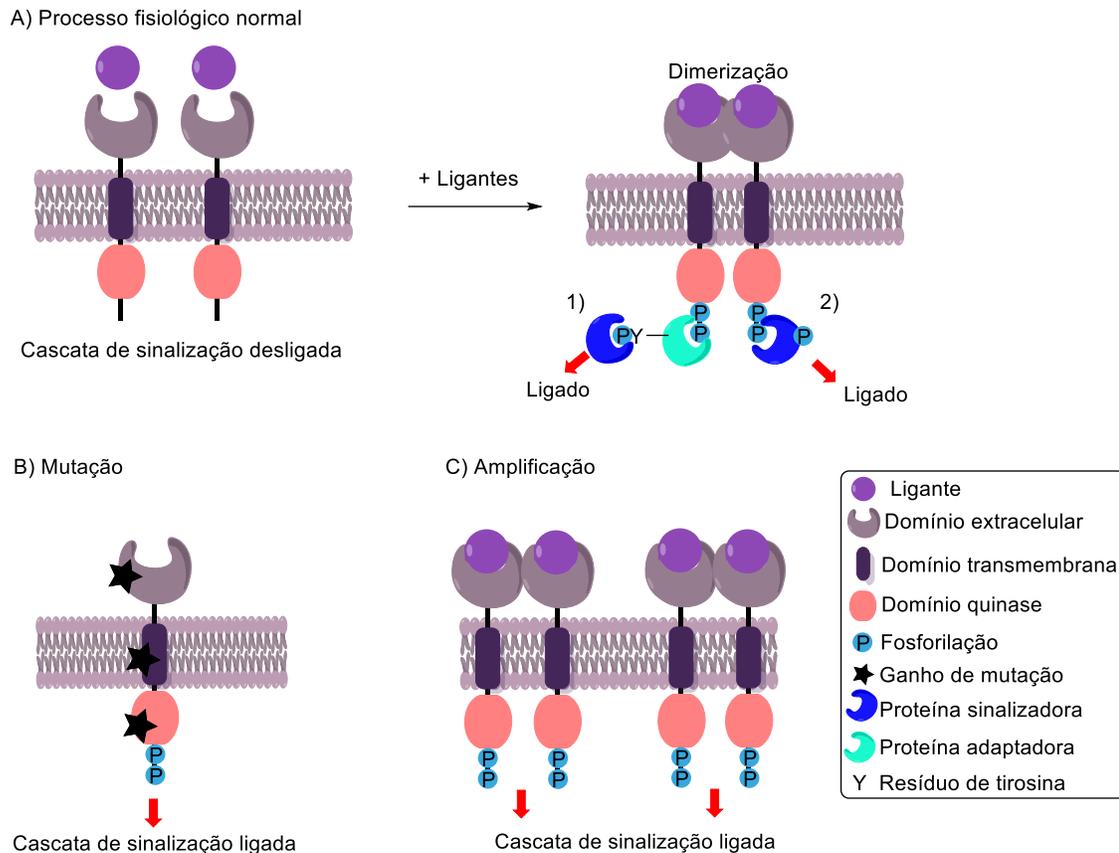


Figura 16 - Mecanismo de ativação fisiológica e oncogênica¹⁶¹

Por serem altamente reguladas, estarem envolvidas na regulação de todo o ciclo de vida celular e funcionarem como receptoras de fatores de crescimento, muitas das RTKs estão correlacionadas com o desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer. Estudos genômicos identificaram o envolvimento de diferentes subfamílias de tirosinas quinases receptoras na progressão do câncer, como: EGFR, VEGFR, PDGFR, MET, entre outros.¹⁶²

As RTKs podem ser ativadas indevidamente, ou por processos de mutação que alteram o funcionamento da proteína fazendo com que ela fosforile sem a presença do ligante (**Figura 16 B**), ou por superexpressão do receptor ou de seu ligante correspondente (**Figura 16 C**). A superexpressão das RTKs é ocasionada normalmente pela amplificação genômica que aumenta a quantidade do receptor no local. Em ambos os casos, há um excesso de substratos fosforilados. Este desequilíbrio altera processos importantes tais como divisão celular e angiogênese, permitindo o desenvolvimento e

crescimento de câncer. Por exemplo, fatores provenientes de tumores podem atuar sobre as VEGFRs (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*) provocando uma maior vascularização do tumor, potencializando o seu crescimento.¹⁶³

O descobrimento e o desenvolvimento de terapias tendo como alvo molecular as RTKs, revolucionaram o tratamento anticâncer. Atualmente, existem diversos fármacos, no mercado ou em testes clínicos, com ação anticâncer tendo como alvo terapêutico as tirosinas quinases receptoras.¹⁶⁴

Além de seu importante papel no desenvolvimento de câncer, as tirosinas quinases receptoras também estão envolvidas em processos inflamatórios, por exemplo: O DDR, que é uma RTK, está envolvido no processo de fibrogênese e é induzido localmente em células epiteliais, inflamatórias e mesangiais,^{dd} após danos mecânicos, químicos ou infecciosos.¹⁶⁵

A desregulação do receptor EGFR, causando anomalias em sua sinalização, está associada ao desenvolvimento de asma e outras doenças pulmonares. Resultados patológicos comuns oriundos da ativação anormal do EGFR são a hiperplasia^{ee} e metaplasia^{ff} de células calciformes¹⁶⁶ com consequente hiperprodução e secreção de mucos (indução da produção de MUC5AC)¹⁶⁷ e remodelamento das vias aéreas (ex.: espessamento da membrana basal)¹⁶⁸ Ademais, o nível de expressão da EGFR no tecido inflamado é diretamente proporcional ao nível de dano observado no epitélio e, também, ao grau de severidade da asma.¹⁶⁹

Portanto, além de seu já estabelecido papel em terapias anticâncer, as tirosinas quinases receptoras têm o potencial de se tornarem alvos terapêuticos no tratamento de doenças inflamatórias ou com componente inflamatório.¹⁷⁰

As principais abordagens terapêuticas envolvendo a inibição das RTKs são: o uso de anticorpos monoclonais, ou o uso de pequenas moléculas inibidoras da tirosina quinase, chamadas de tirfostinas. Os anticorpos monoclonais bloqueiam a ligação receptor-ligante

^{dd} **Células mesangiais:** células encontradas no mesângio do corpúsculo renal.

^{ee} **Hiperplasia:** aumento do número de células em um órgão ou em um tecido.

^{ff} **Metaplasia:** alteração reversível quando uma célula adulta, seja epitelial ou mesenquimal, é substituída por outra de outro tipo celular.

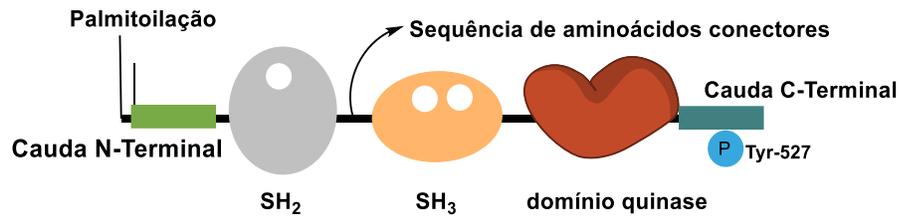
uma vez que interagem com o domínio extracelular das RTKs. Diferentemente do mecanismo de ação dos anticorpos monoclonais, as tirfostinas atuam no domínio intracelular, impedindo a autofosforilação das RTKs, uma vez que essas moléculas competem pelo sítio de ligação do ATP.¹⁷¹

1.3.2. Tirosinas quinases não-receptoras (NRTKs)

Diferentemente das RTKs, as tirosinas quinases não-receptoras (NRTKs) não possuem características de receptor, isto é, não possuem um domínio extracelular ligante e um domínio transmembrana. Na realidade, elas são recrutadas à cascata de sinalização através de interações com um receptor extracelular independente. Alguns exemplos de receptores extracelulares que podem recrutar as NRTKs são: as próprias RTKs mencionadas na seção anterior, os receptores acoplados à proteína G e diferentes receptores do sistema imune.¹⁷² Ou seja, essas proteínas podem funcionar iniciando uma cascata de sinalização e, em outros casos, como um elemento para amplificar um estímulo inicial em uma via de sinalização.

As proteínas não-receptoras podem ser encontradas livres no citoplasma ou ancoradas na membrana celular por via de modificações amino-terminais como a palmitoilação.¹⁷³ A família das NRTKs é agrupada em 9 subfamílias de acordo com as similaridades estruturais de seus domínios (**Tabela 7**). Esses domínios, como ocorre em proteínas sinalizadoras, são reunidos em uma só estrutura através de uma sequência de aminoácidos conectores, não possuindo função separadamente. Além do domínio quinase (catalítico) que todos os integrantes possuem, as subfamílias apresentam outros domínios bastante diversificados. Dependendo da subfamília, as NRTKs podem apresentar domínios sinalizadores adicionais e/ou domínios que medeiam a interação proteína-proteína, proteína-lipídios ou proteína-DNA, tais como SH₂, SH₃ e PH (domínio de homologia com a pleckstrina, do inglês *Pleckstrin Homology*) (**Figura 17 A**).¹⁷⁴

A) Representação da Proteína SRC desnovelada



B) Tirosina quinase SRC inativada e ativada

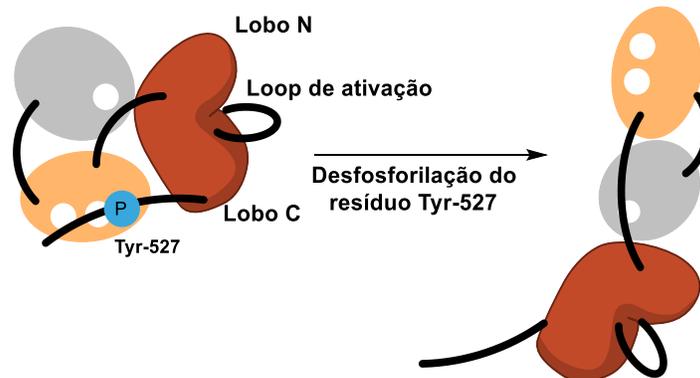


Figura 17 - Representação da tirosina quinase não-receptora SRC. A) Sequência desnovelada dos domínios que compõem a proteína. B) Presença da fosforilação no resíduo de tirosina 527, mantém a enzima desativada, ao ser desfosforilada, a enzima assume conformação ativa e é capaz de fosforilar substratos

O domínio catalítico das NRTKs, aquele com função de fosforilar, possui aproximadamente 300 resíduos de aminoácidos, parte desses resíduos são dispostos em 5 folhas beta e uma hélice alfa, constituindo o lobo N-terminal, enquanto que o restante dos resíduos de aminoácidos constitui o lobo C-terminal, os quais são organizados, majoritariamente, em hélices alfa. O ATP liga-se na cavidade existente entre os dois lobos. O resíduo de tirosina, presente no substrato, interage com os resíduos do lobo C-terminal. As NRTKs são mantidas em seu estado inativado por proteínas e lipídios inibidores e/ou por auto-inibição intramolecular (**Figura 17 B**). Por exemplo, a NRTK c-ABL é inibida pela proteína retinoblastoma. Já como exemplo do processo de auto-inibição, pode-se citar a inibição de NRTKs por interação entre os domínios SH₂ e o C-terminal fosforilado, e entre o domínio SH₃ e o conector SH₂-quinase, como no caso da SRC (**Figura 17 B**).¹⁷⁵

A ativação das NRTKs é mais complexa do que a observada para as RTKs. Essas proteínas podem ser ativadas por meio de uma variedade de sinais intracelulares que promovem a dissociação entre as NRTKs e seus respectivos inibidores e pela transfosforilação por outras quinases.¹⁷⁶ Além disso, as NRTKs podem ser ativadas também ao serem recrutadas por receptores transmembrana, como no caso dos receptores de citocinas. Esses receptores, na maioria dos casos, não possuem um domínio quinase e, portanto, utilizam as tirosinas não-receptoras como subunidades catalíticas cruciais em sua rota de sinalização.¹⁷⁷ Outro exemplo é o caso da tirosina quinase receptora PDGFR. Essa RTK, quando ativada, recruta e ativa a família SRC que é essencial para a propagação do sinal e conseqüentemente, para a regulação de diferentes processos.¹⁷⁸

Assim como as tirosinas quinases receptoras, as não-receptoras são capazes de regular uma infinidade de respostas e processos celulares tais como a diferenciação e a adesão celular, a regulação da expressão de genes, a proliferação, a inibição do crescimento celular, a apoptose, entre outros. Por exemplo, a IL-6 induz a ativação da JAK que, por sua vez, fosforila o STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição) ativando-o.¹⁷⁹ A c-Abl é igualmente importante, sendo capaz de se ligar ao DNA no núcleo e aprisionar o ciclo celular em casos de danos no DNA, levando à reparação ou apoptose.¹⁸⁰ Um outro exemplo de importância das NRTKs na regulação de processos biológicos é a ação da FAK, a qual pode regular o processo de adesão celular e de proliferação.¹⁸¹

Conforme estabelecido acima, as NRTKs possuem diferentes sistemas de regulação de suas atividades, além de serem essenciais em diferentes processos celulares. Desta forma, tem-se que diferentes doenças podem ocorrer como resultado da falha nestes processos regulatórios, destacando-se o câncer e as doenças de cunho inflamatório. Grande parte dos esforços no desenvolvimento de terapias onde as NRTKs são tomadas como alvos terapêuticos destinam-se ao combate do câncer. De fato, muitas das NRTKs conhecidas já foram identificadas como oncogenes (ex.: ABL, FES e Src). Além do que, a disfunção da atividade sinalizadora das quinases está associada ao crescimento de tumores malignos.¹⁸² Na última década, o papel das NRTKs no desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias tem sido estudado, devido à importância dessas proteínas em processos regulatórios-chave no desenvolvimento dessas doenças.¹⁸³

Portanto, as NRTKs não só são alvos terapêuticos importantes no desenvolvimento de terapias anti-câncer, como são um alvo promissor no tratamento de doenças autoimune e inflamatórias.

Diversas formas de modulação da atividade das NRTKs vêm sendo descobertas ao longo dos anos. Isso porque, os papéis e os diferentes caminhos de sinalização em variados processos regulados por tirosinas quinases não-receptoras, como a ação no sistema imune, no metabolismo ósseo ou no funcionamento das plaquetas, para citar alguns, têm sido elucidados. Além disso, avançou-se no conhecimento de novas NRTKs e do papel que este tipo de proteína exerce nos processos celulares importantes para o desenvolvimento do câncer como a proliferação celular, a angiogênese e a apoptose, bem como nos processos não-oncogênicos. As NRTKs foram um dos primeiros fatores identificados como reguladores do desenvolvimento de doenças autoimunes, em consequência de seu papel crucial no desenvolvimento e ativação das células B e T. Essas células respondem à estimulação de citocinas *via* sinalização mediada por NRTKs como a JAK, a SRC, a SYK e a CSK. A hiperatividade de células B está associada à produção de anticorpos auto-reativos⁹⁹ que contribuem para a patogênese do lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide.^{155,184} Já o funcionamento desregulado de células T pode contribuir para a patogênese da esclerose múltipla e da artrite reumatoide.^{177b} As NRTKs também estão envolvidas no desenvolvimento e progressão de diferentes doenças inflamatórias de pele, tais como psoríase e dermatite atópica. Esse envolvimento com doenças inflamatórias é explicado pela importante contribuição das NRTKs na regulação de diferentes citocinas, como é explicado no artigo escrito por Page e colaboradores.⁴⁴

Visto a importância dessas enzimas (RTKs e NRTKs) na regulação de diferentes processos cruciais no corpo humano e sua correlação com diferentes patogêneses, a elaboração de novos inibidores é uma estratégia importante no desenvolvimento de tratamentos alternativos à terapia vigente. Essas enzimas têm sido objetos das pesquisas

⁹⁹ **Anticorpos auto-reativos:** São anticorpos que reagem contra elementos do próprio corpo.

de numerosos programas de desenvolvimento de fármacos nas indústrias farmacêuticas. De fato, inúmeros compostos são relatados na literatura com atividade inibitória de RTKs e NRTKs. Até 2019, haviam 52 pequenas-moléculas inibidoras de proteína quinase aprovadas pela FDA (*Federal Drug Administration*), das quais 28 eram inibidoras de RTKs e 11 de NRTKs. Devido à complexidade, à abundância e à variedade dessas enzimas, o completo entendimento da ação das quinases na comunicação celular ainda é motivo de pesquisa, e, configura um desafio para a ciência moderna.¹⁸⁵

É importante ressaltar que foram dados apenas alguns exemplos neste trabalho, pois, embora os mecanismos de ação sejam muito semelhantes entre si existem diversas RTKs e NRTKs, cada uma com seu ativador específico e com sua própria proteína-substrato.¹⁸⁵

1.3.3. Tirfostinas

A primeira menção de inibidores de proteínas quinases ocorreu por volta de 1980,¹⁸⁶ quando se demonstrou que vários compostos naturais, como a quercetina **24**, a genisteína **25** e a erbstatina **26** (**Figura 18**) apresentaram atividade inibitória frente ao EGFR. Apesar de possuírem baixa seletividade e potência, estes compostos serviram como base no *design* de compostos novos e mais potentes.

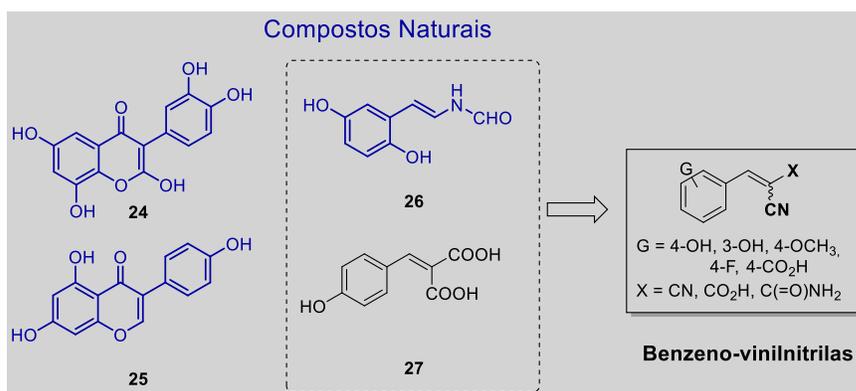


Figura 18 - Primeiros compostos testados como inibidores de tirosina quinase e *design* de benzeno-vinilnitrilas

Levitzki¹⁸⁷ e colaboradores sintetizaram diversas benzeno-vinilnitrilas que apresentaram boa inibição competitiva do EGFR, (**AG18** IC₅₀ = 40 μM; **AG99** IC₅₀ = 4 μM; **AG82** IC₅₀ = 3 μM) (**Figura 19**) e excelente seletividade.¹⁸⁸ Essas benzeno-vinilnitrilas foram sintetizadas com base na estrutura da erbstatina **26** (IC₅₀ = 14 μM)¹⁸⁷ e do ácido benzilidenomalônico **27** (**Figura 18**), o qual apresentou atividade inibitória frente a IRK (K_i = 4,84 mM) em um estudo realizado por Levitzki e colaboradores.¹⁸⁹ Dessa forma, surgiu a classe de pequenas-moléculas denominada tirfostinas (do inglês, tyrphostins - **Tyrosine Phosphorylation Inhibitors**). A partir dos resultados obtidos para as tirfostinas, concluiu-se que era possível obterem-se inibidores de tirosinas quinases com baixíssima toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que alavancou o interesse por esta classe de moléculas.

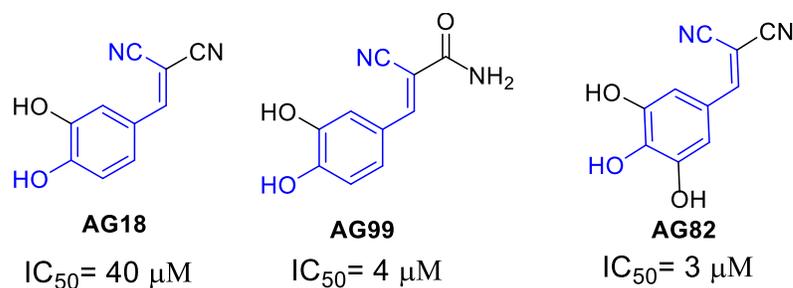


Figura 19 - Exemplos de benzeno-vinilnitrilas com atividade inibitória frente ao EGFR

No estudo de Levitzki com as benzeno-vinilnitrilas foi observado que a presença da dupla ligação era necessária para a atividade inibitória. Além disso, a introdução de uma hidroxila no anel aromático resultou em um aumento de 10-15 vezes na potência dos compostos.¹⁸⁸ Posteriormente, a estrutura das moléculas foi sendo modificada para mimetizar o ATP e aumentar sua potência. Na maioria dos casos, foram adicionados núcleos quinazolínicos.

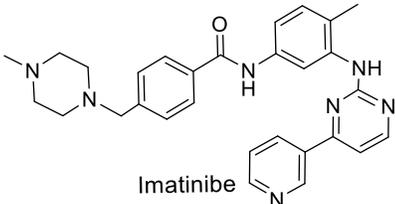
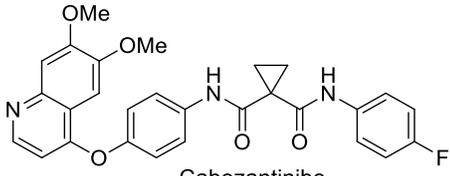
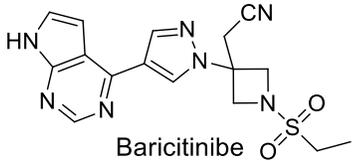
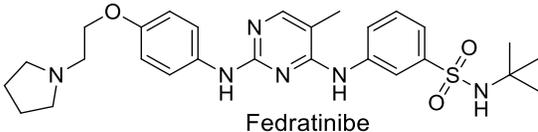
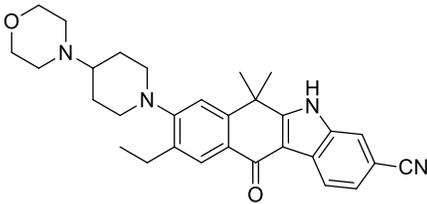
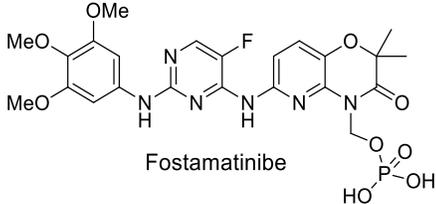
As tirfostinas podem ser separadas em três classes: aquelas que competem com o substrato e não competem com ATP, as que competem com o ATP, e as que competem tanto com o ATP quanto com o substrato. Entretanto, grande parte dos inibidores avaliados compete com o ATP. Apesar das similaridades estruturais dos sítios de interação com ATP entre as diferentes tirosinas quinases, as pequenas diferenças

existentes, permitem que determinados fármacos atuem em uma subclasse sem atuar sobre toda a família. Essa característica confere seletividade às tirfostinas.¹⁸⁶ Acredita-se que inibidores competitivos pelo substrato são mais seletivos, devido a maior diversidade existente no domínio de interação com o substrato.

Desde então, diferentes classes de moléculas têm sido avaliadas com relação a sua atividade inibitória de tirosinas quinases, ampliando, significativamente, o universo de tirfostinas conhecidas. Como já menciono, atualmente, existem diferentes tirfostinas aprovadas para usos terapêuticos destinados aos mais diferenciados alvos, tais como: imatinibe, cabozantinibe, fedratinibe, alectinib, entre outros. Alguns exemplos podem ser vistos na **Tabela 8**.¹⁸⁵

A classe das tirfostinas é composta de moléculas estruturalmente bem diversas, de forma que, no presente trabalho serão enfatizadas as tirfostinas mais próximas em estrutura àquelas relatadas por Levitzki¹⁸⁷ no seu trabalho pioneiro (**Figura 19**). Essas tirfostinas originais foram empregadas como protótipos para a síntese das moléculas avaliadas nesta dissertação.

Tabela 8 - Moléculas inibidoras de tirosina quinase aprovadas pela FDA

Inibidor	Alvo molecular	Aplicação terapêutica
 <p>Imatinibe</p>	BCR-Abl	leucemia eosinofílica crônica, doença mieloproliferativa (uso liberado em 2001)
 <p>Cabozantinibe</p>	Ret; VEGFR2	câncer de tireoide medular, carcinoma de células renais (uso liberado em 2012)
 <p>Baricitinibe</p>	JAK 1/2	artrite reumatóide (uso liberado em 2018)
 <p>Fedratinibe</p>	JAK 2	mielofibrose (uso liberado em 2019)
 <p>Alectinibe</p>	ALK, Ret	câncer de pulmão de células não pequenas (uso liberado em 2015)
 <p>Fostamatinibe</p>	Syk	trombocitopenia imune crônica (uso liberado em 2018)

1.4. Ácidos arilborônicos

Compostos contendo boro, como os ácidos arilborônicos, têm ganhado a devida atenção na química medicinal nas últimas décadas. O aumento do interesse por essa classe de moléculas é devido, em grande parte, às propriedades únicas desse elemento. Historicamente, os ácidos arilborônicos são conhecidos apenas como intermediários versáteis na síntese orgânica. Esses intermediários facilitam a formação de diferentes tipos de ligação através de reações como hidroboração¹⁹⁰ (C-H, C-OH), acoplamento de Suzuki-Miyaura¹⁹¹ (C-C) e acoplamento de Chan-Lam¹⁹² (C-N e C-O). Apesar da grande importância dos ácidos borônicos como intermediários na síntese orgânica, as aplicações e as potencialidades para novos usos não estão restritas à síntese. Ao contrário, esses compostos podem ser empregados na química supramolecular, na química medicinal, na medicina diagnóstica, como ligantes em colunas cromatográficas ou géis de eletroforese para análise química, na determinação do excesso enantiomérico de moléculas quirais por ressonância magnética nuclear, como sensores químicos por fluorescência, colorimetria, etc.

No que diz respeito à Química Medicinal, o potencial dos ácidos borônicos foi ignorado por muito tempo, em parte, pela convicção de que o boro fosse tóxico. Contudo, diferentes estudos indicam que esta concepção de que o boro é inerentemente tóxico é infundada. Na realidade, o boro é um elemento valioso para o emprego em Química Medicinal.¹⁹³ A utilidade dos compostos de boro para a Química Medicinal tem sido comprovada nas últimas duas décadas à medida que o conhecimento sobre a química dos compostos de boro avançou. Neste período, ficou estabelecido o papel que o boro exerce em diversos sistemas vivos, como as plantas por exemplo, além de terem sido publicados dados e estudos sobre a toxicidade dos compostos de boro. Finalmente, em 2005 foi aprovado pelo FDA o bortezomibe, um boronopeptídeo empregado no tratamento do mieloma múltiplo e comercializado pela Millennium Pharmaceuticals com o nome de Velcade **28 (Figura 20)**.¹⁹⁴ Mais recentemente, em 2015, a FDA aprovou o ixazomibe **29 (Figura 20)**, cuja estrutura é semelhante ao bortezomibe. Este foi desenvolvido para o tratamento de pacientes com recaída ou refratários. O seu mecanismo de ação está correlacionado com a inibição da atividade do tipo

quimiotripsina do proteosoma 20S, que induz à apoptose das linhagens das células do mieloma múltiplo.¹⁹⁵ A aprovação desses compostos impulsionou o interesse da sociedade científica em direção ao desenvolvimento de novos fármacos baseados na química do boro, de tal maneira que nos últimos anos diversos estudos relatam diferentes atividades biológicas promissoras como: antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antiparasitária entre outros.¹⁹⁶

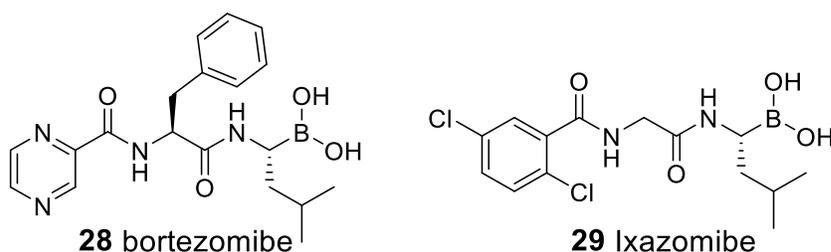


Figura 20 - Estrutura do Bortezomibe (Velcade®) e do Ixazomibe (Ninlaro®)

Dentre os compostos com boro (**Figura 21**), os ácidos borônicos **31** são particularmente relevantes para a química medicinal, em razão de suas características peculiares, tais como: fácil interconversão da forma trigonal planar neutra sp^2 para a forma sp^3 tetraédrica carregada negativamente, dependendo da condição fisiológica, interação forte com compostos contendo a unidade diol, sua acidez de Lewis e capacidade biomimetização.¹⁹⁷ Grande parte das características únicas dessa classe de moléculas advém da presença do boro. Em razão dessas propriedades, os ácidos borônicos têm sido usados como inibidores de enzimas, sensor, e transportadores transmembrana, por exemplo.¹⁹⁸

Ácidos borônicos são compostos que apresentam um grupo orgânico (R) ligado a uma unidade $B(OH)_2$: $R-B(OH)_2$. O grupo R orgânico pode ser derivado de um alcano (alquila), de um alqueno (alquenila), de um alquino (alquinila) ou de um aromático (arila). Como possuem uma ligação C-B, são considerados organoboros ou organometálicos de boro. Trata-se de compostos sintéticos e que podem ser considerados derivados do ácido bórico **30** (**Figura 21**), isto porque a troca de uma das hidroxilas do ácido bórico geraria um ácido borônico. De fato, em muitos casos, a degradação desses compostos produz ácido bórico. Portanto, estruturalmente, os ácidos borônicos são compostos trivalentes

onde o boro, átomo central com hibridização sp^2 , liga-se a duas hidroxilas (ligação B-O) e a um grupo orgânico (**Figura 21**).

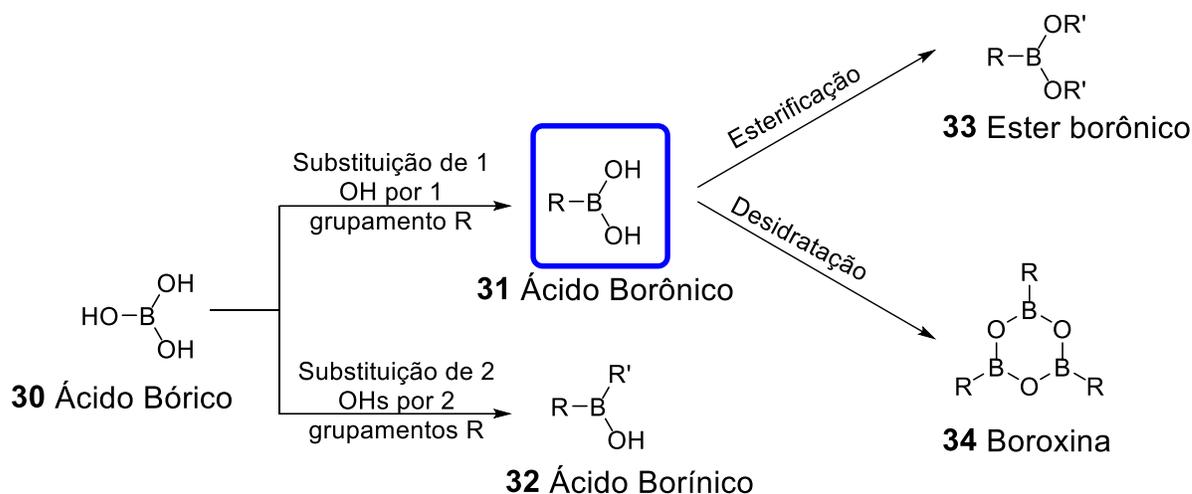


Figura 21 - Compostos de boro

Com relação à força das ligações, a ligação B-O é favorecida termodinamicamente em comparação com a ligação C-B. Essa diferença de força pode ser evidenciada pelos comprimentos e pela energia da ligação (**Tabela 9**), já que a ligação B-O é mais forte do que a ligação C-B.^{197,199}

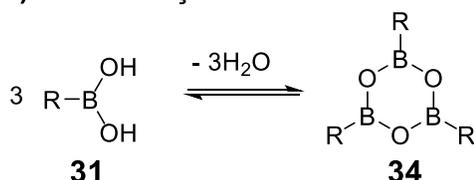
Tabela 9 - Energias e comprimentos de ligação padrão^{197,199}

Ligação B-X	E (kJ/mol)	Comprimento da ligação (Å)
B-C	323	1,55-1,59
B-O	519	1,35-1,38

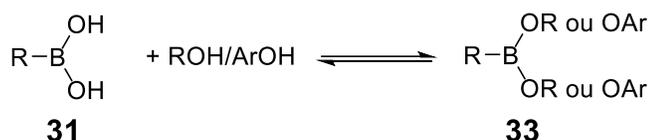
Os ácidos borônicos são propensos à desidratação quando aquecidos (**Esquema 5 A**).²⁰⁰ Essa reação ocorre quando três moléculas de ácido borônico reagem entre si, liberando três moléculas de água. A liberação de água permite a formação de um anidrido cíclico chamado de boroxina **34** (**Figura 21**). Os ácidos borônicos também reagem com álcoois e fenóis gerando ésteres borônicos **33** (**Esquema 5 B**).²⁰¹ Tanto a formação de anidridos como a esterificação são características úteis da química do boro que têm sido

bem aproveitadas na química supramolecular para o desenvolvimento de novos materiais com propriedades eletrônicas, catalíticas ou de armazenamento de gases, para citar algumas.²⁰²

A) Desidratação



B) Esterificação



Esquema 5 - Reações de desidratação e esterificação sofridas por ácidos borônicos

A formação dessas estruturas oligoméricas a partir dos ácidos borônicos, apesar de interessante para a química de materiais, dificulta a caracterização dos mesmos. Por exemplo, o processo de aquecimento em estado sólido, necessário à determinação do ponto de fusão pode levar à desidratação dos ácidos borônicos com conseqüente formação de boroxinas. Desta forma, o ponto de fusão obtido reflete o ponto de desidratação e/ou decomposição.^{200c} Adicionalmente, deve-se ter em mente que cada amostra de ácido borônico pode apresentar diferentes graus de hidratação, podendo existir um percentual da amostra sob a forma de ácido borônico e outro sob a forma de um anidrido de boro. Isso se deve tanto à forma de obtenção deste ácido quanto ao processo de armazenamento. Uma vez que o grau de hidratação das diferentes amostras não é conhecido, essa incerteza irá refletir-se na falta de reprodutibilidade dos pontos de fusão relatados. Desta forma, fazem-se necessários métodos mais sofisticados para determinação dos pontos de fusão desses compostos.²⁰³

Quanto à espectroscopia na região do infravermelho, as bandas de estiramento características para ligação OH são observadas entre 3300 e 3200 cm⁻¹. Por outro lado, uma banda forte em 680-705 cm⁻¹ é indicativa da presença de anidrido.²⁰⁴

Outra característica peculiar dos ácidos borônicos é sua acidez. Apesar da presença de duas hidroxilas, é o átomo de boro, deficiente em elétrons, responsável pelo caráter ácido moderado dessas moléculas. Essa acidez é justificada pela presença de um orbital *p* vazio, pertencente ao boro, disponível para receber pares de elétrons (**Figura 22**).²⁰⁵ Isto é, pelo menos no primeiro momento, não é a doação de um próton (acidez de Brønsted) de uma das hidroxilas com liberação de H_3O^+ que caracteriza a acidez dos ácidos borônicos. O processo começa com o ácido borônico agindo como um ácido de Lewis, recebendo a doação de um par de elétrons da água em seu orbital *p* vazio. O aduto gerado age como um ácido de Brønsted, ao interagir com uma segunda molécula de água, liberando H_3O^+ (**Esquema 6**).²⁰⁵ Isso permite a determinação do pH do meio pela alteração da concentração de H_3O^+ e, conseqüentemente, a determinação de uma constante de acidez (K_a). O K_a dos ácidos borônicos é influenciado pela natureza do grupo orgânico ligado ao boro, em geral, podendo variar de 4,0 a 8,8 (**Tabela 10**).²⁰⁶ O produto da reação ácido-base que envolve um ácido borônico tem geometria tetraédrica, com o boro hibridizado em sp^3 e carregado negativamente.

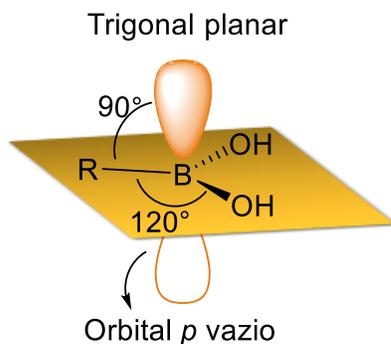
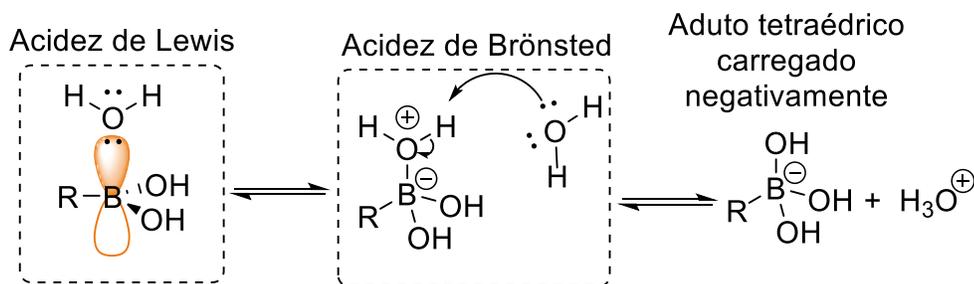
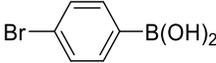
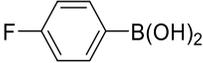
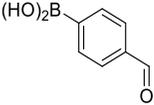
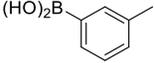
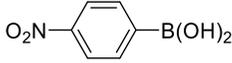
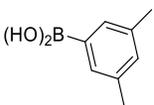
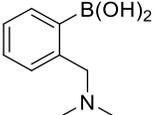
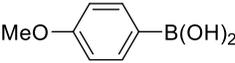
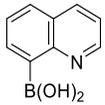


Figura 22 - Estrutura dos ácidos borônicos



Esquema 6 - Reação entre a água e ácidos borônicos²⁰⁵

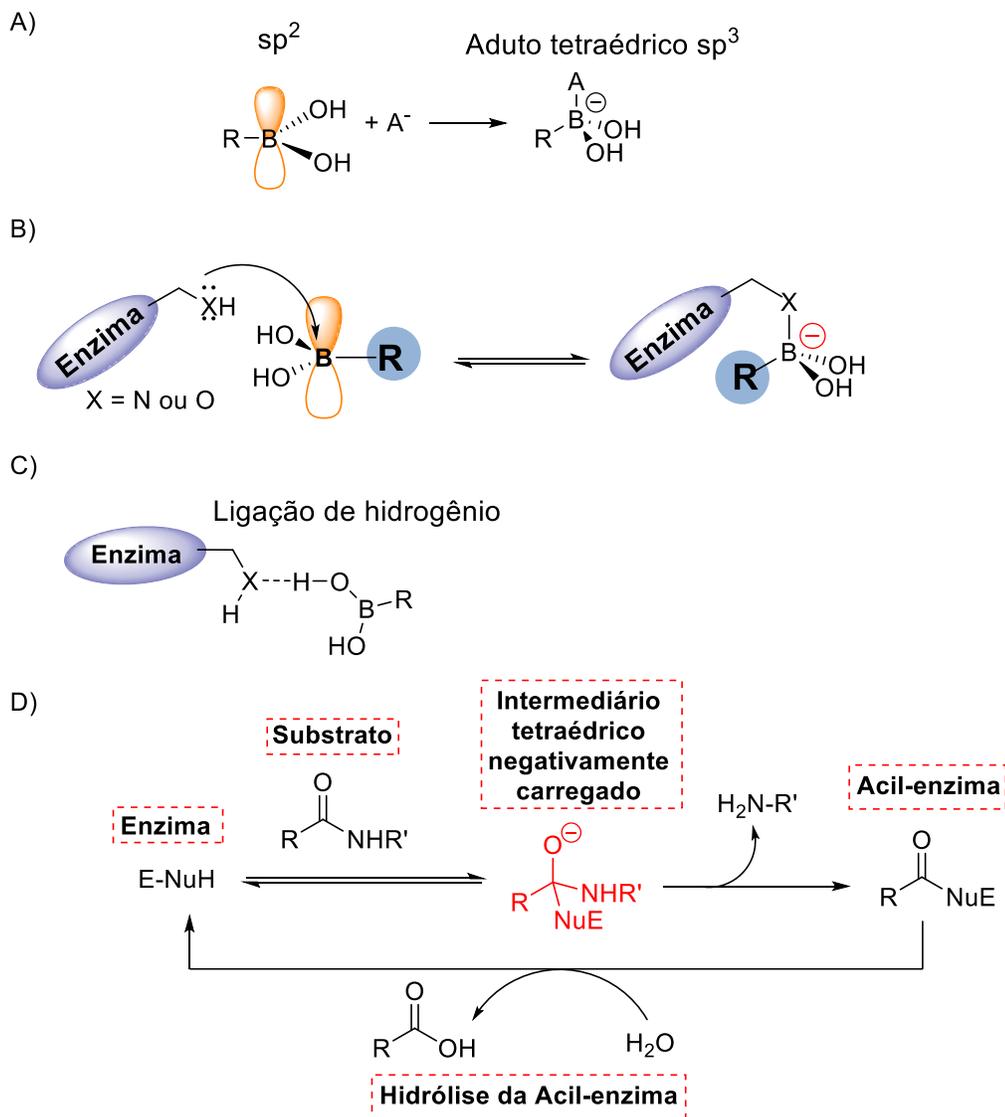
Tabela 10 - Constante de ionização para alguns ácidos borônicos^{197, 207}

R-B(OH) ₂	pK _a	R-B(OH) ₂	pK _a
B(OH) ₃ (ácido bórico)	9,0		8,6
CH ₃ -B(OH) ₂	10,4		9,1
Ph-B(OH) ₂	8,9		7,8
	9,0		7,1
	9,1		5,3
	9,3		4,0

Além da água, outras bases de Lewis podem interagir com ácidos borônicos para gerar adutos tetraédrico (**Esquema 7 A**). Por exemplo, íons como o fluoreto ou o hidróxido podem coordenar-se ao boro, além de álcoois, fenóis, aminas, etc.²⁰⁸ Esse mecanismo ácido-base pode ocorrer pela interação de grupos hidroxila ou amino presentes em resíduos dos aminoácidos de uma enzima, o que pode ser uma via de ação pela qual um ácido borônico atue como um inibidor enzimático. (**Esquema 7 B**).

Além da possibilidade de interações covalentes com bases de Lewis, os ácidos borônicos podem também realizar ligações de hidrogênio, tornando o grupamento B(OH)₂

altamente versátil em termos de possibilidades de interação com sítios ativos de enzimas
(Esquema 7 C).



Esquema 7 - Acidez de Lewis dos ácidos borônicos e analogia ao estado de transição (E.T.[‡]) de proteases. A) Mudança de hibridização sp^2 em sp^3 após coordenação com um ânion. B) Interação ácido-base de Lewis entre a hidroxila de uma enzima e o ácido borônico. C) Interação enzima/ácido borônico através de ligação de hidrogênio. D) Interação enzima com seu substrato natural²⁰⁹

Outra característica importante dessa classe de moléculas é a possibilidade de biomimetização. O boro e o carbono possuem muitas similaridades com respeito a sua estrutura e às propriedades eletrônicas, mas não com relação a sua reatividade. Isso significa que o boro pode mimetizar o carbono no processo de interação com estruturas bioativas. Entretanto, o efeito gerado por essa interação pode ser totalmente distinto já que pela diferença de reatividade entre o boro e o carbono, a sequência de reações subsequentes à formação do aduto entre o composto de carbono e a enzima é diferente do que ocorre para o aduto entre esta enzima e o composto de boro.²⁰⁹ Esse é um dos princípios em que se baseia o *design* de inibidores de hidrolases análogos do estágio de transição. Os ácidos borônicos, em particular, mimetizam ácidos carboxílicos e seus derivados, presentes em substratos naturais das enzimas. Ao interagir com uma base de Lewis presente no sítio ativo da hidrolase, o ácido borônico forma um intermediário tetraédrico carregado negativamente da mesma forma que o substrato da enzima (uma amida, por exemplo) forma um intermediário tetraédrico carregado ao interagir com a enzima (**Esquema 7 B e D**).²⁰⁹ Os ácidos borônicos, como as amidas, são centros eletrofílicos que podem ser atacados pelos nucleófilos presentes nos sítios ativos das hidrolases. As hidrolases podem possuir resíduos de serina ou treonina, por exemplo, no seu sítio ativo, os quais possuem uma hidroxila que age como um nucleófilo frente ao substrato natural. Outras hidrolases podem possuir outros resíduos de aminoácidos no seu sítio ativo, onde outros grupos como SH, COOH, NH₂, por exemplo, exercem a função de nucleófilos para atacarem o centro eletrofílico presente no substrato. Na reação com o substrato natural, a acil-enzima gerada é hidrolisada, liberando a enzima livre (**Esquema 7 D**). Na reação da enzima com um composto de boro, a enzima permanece ligada ao aduto tetraédrico gerado, não havendo a etapa da hidrólise que ocorre com o substrato natural e que é responsável pela liberação da enzima livre para interagir com outra molécula de substrato (**Esquema 7 B**).²⁰⁹ Assim, pode-se considerar que a ligação com o ácido borônico promoveu a inibição da enzima. A reação ácido-base entre um ácido borônico e um grupo presente em uma enzima é reversível. Esse fato, é importante, uma vez que a inibição promovida pelo ácido borônico é reversível, podendo-se recuperar a enzima. Isso tem um impacto grande na toxidez de um inibidor. Inibidores irreversíveis, como os agentes alquilantes, não permitem a recuperação da enzima necessária aos

processos biológicos normais do organismo, resultando em uma toxidez mais elevada. Desta forma, o ácido borônico proporciona um tipo de inibição vantajosa em comparação a outros inibidores.²⁰⁹

A química dos ácidos borônicos é bastante ampla tanto no que tange aos processos de preparação, quanto nas propriedades^{197,196b, 210} e aplicações destes compostos.²¹¹ Entretanto, como no presente trabalho, objetiva-se o preparo de compostos para fins medicinais, serão abordados nas seções seguintes exemplos e informações relativas ao uso dos ácidos borônicos como fármacos.

1.4.1. Ácidos arilborônicos como compostos bioativos

Uma classe de inibidores enzimáticos importantes no desenvolvimento de fármacos é a dos análogos dos estados de transição de hidrolases. Os ácidos borônicos podem formar adutos tetraédricos carregados negativamente com o sítio ativo de enzimas envolvidas em processos biológicos importantes, levando a um estado de transição semelhante àquele do intermediário tetraédrico negativamente carregado proveniente da interação do substrato natural com a enzima. Outras formas de interação destes compostos com alvos-moleculares importantes para o desenvolvimento de terapias, como as enzimas e receptores, são as ligações de hidrogênio formadas entre a unidade $B(OH)_2$ e resíduos de aminoácidos presentes na estrutura do alvo e a formação de um aduto tetraédrico por interação desta unidade com um grupo da enzima que atue como uma base de Lewis. Essas interações contribuem para o ancoramento do inibidor no alvo (**Figura 23**). Os relatos dos ácidos borônicos como inibidores enzimáticos²¹² não se restringem apenas às proteases.²¹³ Há relatos da atuação dos ácidos borônicos na inibição de diversos alvos. Por exemplo, esses compostos podem ser inibidores de proteassomas,²¹⁴ de arginases,²¹⁵ de óxido nítrico sintases,²¹⁶ de transpetidases,²¹⁷ entre outros. Nos inibidores enzimáticos contendo ácidos borônicos, a porção borono é essencial para a sua atividade. Isso porque confere à molécula seletividade frente a outras enzimas, além de mimetizar a função ácido carboxílico presente nos substratos naturais (**Figura 23**).

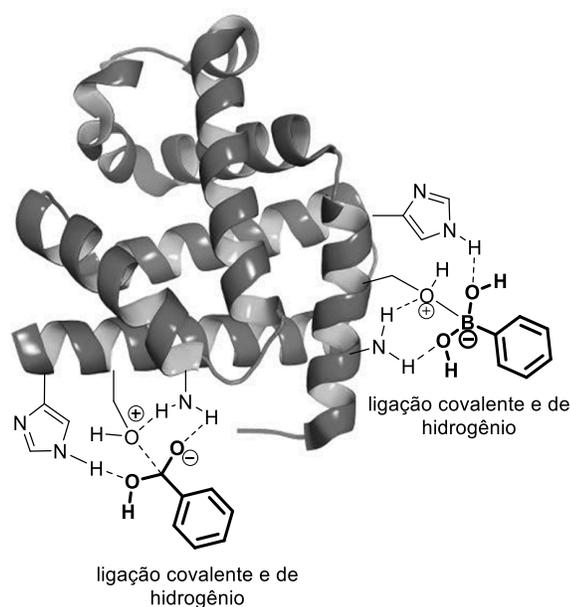


Figura 23 - Semelhanças entre as interações proteína alvo/ácido borônico e proteína/ácido carboxílico

Embora o início das pesquisas sobre a aplicabilidade dos ácidos borônicos em química medicinal tenha sido com ácidos borônicos simples, como os arilborônicos; atualmente, não é mais assim. Ao contrário, relatam-se estruturas muito elaboradas contendo a unidade $B(OH)_2$. Isso se deve ao fato de que o conhecimento de ferramentas de síntese para instalar o grupo $B(OH)_2$ aumentou bastante. Uma vez que esses compostos se tornaram mais disponíveis a partir da síntese, os estudos relativos às aplicações desses compostos em diferentes campos também cresceram. No presente trabalho, será dado um enfoque nos ácidos arilborônicos, relatando-se a seguir, algumas das aplicações dos mesmos na química medicinal.²¹⁸

Nas terapias de doenças causadas por bactérias patogênicas, é comum utilizar-se um inibidor de β -lactamase (ex.: ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam) em conjunto com um antibiótico β -lactâmico. O anel β -lactâmico (**Figura 24**) é essencial no antibiótico no processo de inibição da construção da parede celular das bactérias.²¹⁹ Um dos fenômenos de resistência responsáveis por diminuir a eficácia deste tipo de abordagem terapêutica consiste no desenvolvimento por parte dos micro-organismos de β -lactamases capazes de hidrolisarem o anel β -lactâmico dos antibióticos.²²⁰ No **esquema**

8, tem-se um exemplo de uma lactamase do tipo serino-protease, a qual utiliza um resíduo de serina presente em seu sítio ativo para atuar como um nucleófilo no processo de hidrólise e, portanto, inativação, do antibiótico β -lactâmico. Os inibidores de β -lactamases disponíveis no mercado não fazem frente à diversidade de β -lactamases apresentadas pelos micro-organismos, tornando necessária a pesquisa por novos inibidores.²²¹ Ácidos arilborônicos têm sido relatados na inibição de β -lactamases, mostrando-se úteis no *design* de novos fármacos, inclusive demonstrando eficácia sobre lactamases para as quais o ácido clavulânico e os demais inibidores de lactamases disponíveis falham. O mecanismo pelo qual os ácidos arilborônicos parecem agir para inibir as lactamases das bactérias consiste na mimese da carbonila lactâmica do antibiótico (substrato das lactamases). Neste caso, a serina presente na lactamase ataca o boro do ácido arilborônico formando um intermediário tetraédrico negativamente carregado, ou seja, o composto mimetiza o estado de transição que leva ao intermediário tetraédrico do substrato natural destas enzimas. Na **figura 24**, mostram-se alguns dos ácidos arilborônicos (**35-40**) relatados com atividade frente a lactamases (ex. de enzimas liberadas por bactérias patogênicas: TEM-1, AmpC, P99, KCP-2).²²²

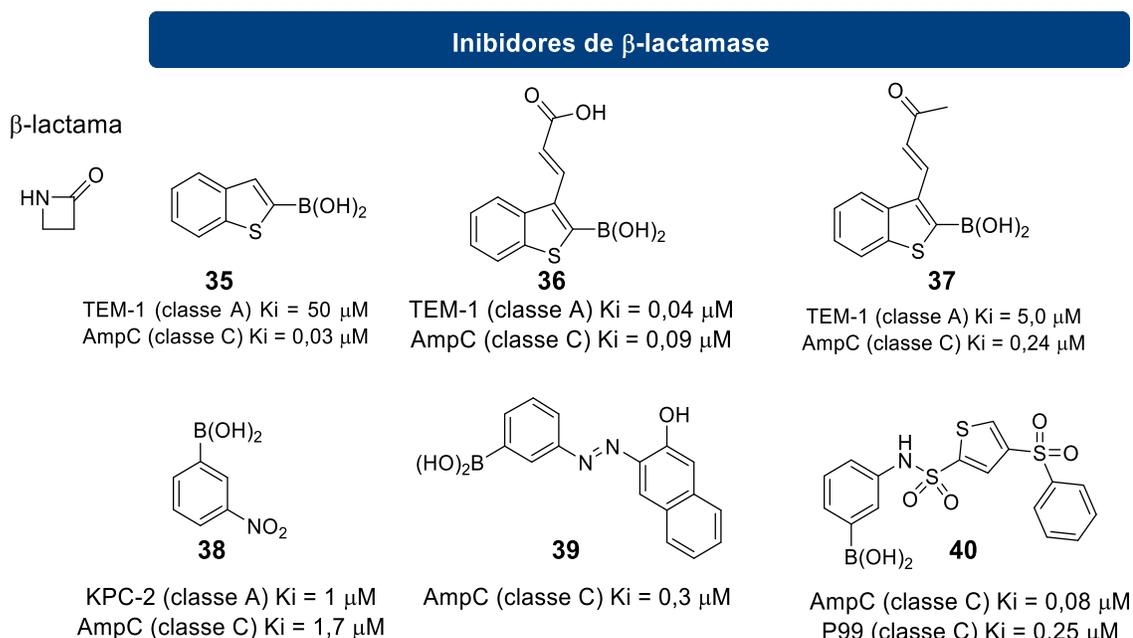
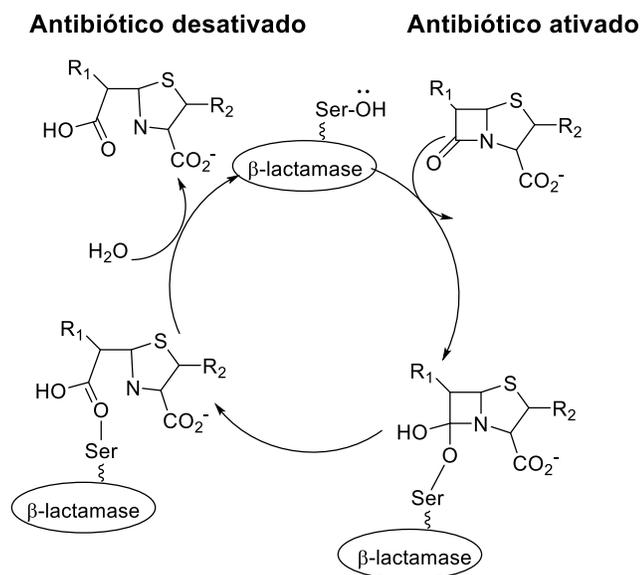


Figura 24 - Anel β -lactama e inibidores de enzimas β -lactamases



..

Esquema 8 - Esquema de intermediários da hidrólise de um antibiótico β-lactâmico por uma serino β-lactamase²²³

Diferentes estratégias podem ser abordadas no desenvolvimento de fármacos anticâncer. Há relatos da utilidade dos ácidos arilborônicos como anticânceres que abordam diferentes alvos moleculares.²²⁴

O uso de agentes antimitóticos que tenham como alvo o sistema de microtúbulos de células eucarióticas,²²⁵ e, portanto, atuem no processo de divisão celular, é uma estratégia de terapia anticâncer. Os microtúbulos são formados por α e β-tubulinas.²²⁶ A tubulina possui diferentes sítios de ligação, os quais quando acessados, resultam na inibição da polimerização dos microtúbulos, desestabilizando o processo de formação dos mesmos. Como exemplos de ligantes de tubulinas que são empregados como antimitóticos na terapia do câncer são os alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina, os taxanos (paclitaxel, docetaxel) e as colchicinas.²²⁷

A combretastatina A-4 **41 (CA-4)** é um exemplo de produto natural que interage com a tubulina no sítio de ligação conhecido como sítio da colchicina **42 (Figura 25 A e B)**. Embora possua atividade antimitótica potente, a combretastatina A-4 não pôde avançar nos testes clínicos por possuir uma lipofilicidade demasiado elevada.^{196a} A fim de se

obterem compostos com melhor perfil farmacocinético, a combretastatina A-4 tem sido empregada como um protótipo a partir do qual outros ligantes de tubulina são desenhados. O grupo de Kong, por exemplo, substituiu as hidroxilas presentes na estrutura da combretastatina A-4, no anel fenólico B, por unidades B(OH)₂. Esse grupo preparou borono derivados diastereoisoméricos (*cis* e *trans*) da combretastatina A-4 (**Figura 25, 43a e 43 b**).²²⁸ No estudo de Kong, ficou demonstrado que o borono derivado *cis* **43a** apresenta potência superior à da combretastatina A-4 na inibição da polimerização da tubulina (IC₅₀ = 2,0 ± 0,1 μM), e, maior citotoxicidade para linhagens de células MCF-7 de câncer de mama humano (IC₅₀ = 32 ± 21 nM). Além disso, o estereoisômero *cis* **43a** não foi somente mais potente na inibição da polimerização de tubulina (*cis*IC₅₀ = 1,5 ± 0,2 μM *versus trans*IC₅₀ = 7,8 ± 1,4 μM) do que o *trans* **43b**, mas também mais citotóxico quando avaliado frente às linhagens de células MCF-7 de câncer de mama humano (*cis*IC₅₀ = 17 ± 5 nM *versus trans*IC₅₀ = 470 ± 140 nM). Outra característica importante que o derivado borônico *cis* apresentou foi uma maior solubilidade em água em pH = 2 que a combretastatina A-4, o que representa um ganho sob o ponto de vista farmacocinético. O grupo de Kong, empregando um estudo de *docking* molecular, fez inferências quanto ao mecanismo de ação do derivado **43a**, relatando que a ação do mesmo se dá por deslocamento competitivo ao ligar-se por meio de ligações de hidrogênio fortes a resíduos de aminoácidos da subunidade α da tubulina.²²⁸

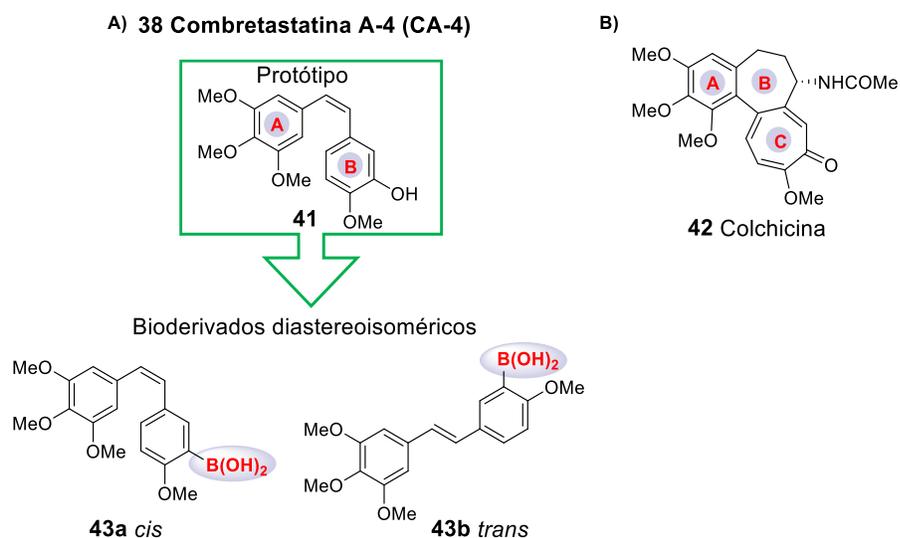


Figura 25 - Estrutura da combretastatina A-4, da colchicina e dos análogos borônicos da **CA-4**

O grupo de Nakamura também verificou o efeito da unidade B(OH)₂ no anel aromático B da *cis*-combretastatina A-4, relatando que a ação dos derivados de boro na proliferação celular pode ocorrer tanto por diminuição da formação de microtúbulos quanto por indução da apoptose (**Figura 26**).²²⁹ O teste de inibição de crescimento celular foi realizado com as linhagens B-16 e 1-87, para as quais os derivados que continham a unidade B(OH)₂ na posição *meta* (**44a-d**) apresentaram um resultado superior (células B-16: IC₅₀ = 0,0063 μM; Células 1-87: IC₅₀ = 0,013 μM), comparativamente aos *para*-substituídos (**45a-b**).

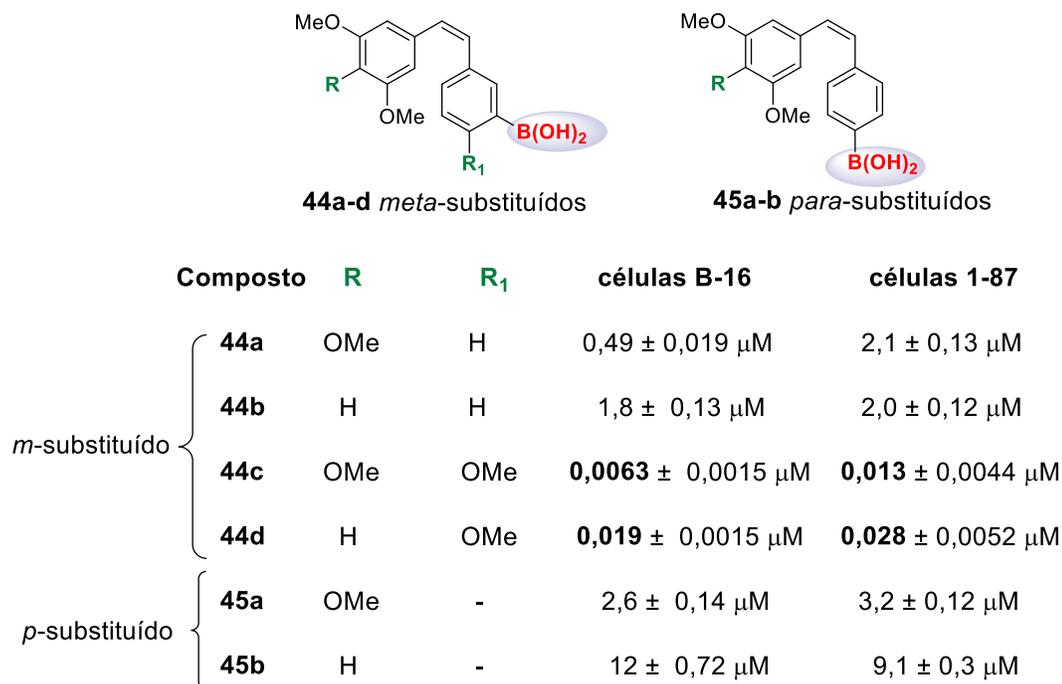


Figura 26 - Z-Estilbenos borônicos com atividade anti-proliferativa²²⁹

O EGFR exerce um papel muito importante na proliferação celular, sendo um alvo molecular importante no desenvolvimento de terapias de tipos diversos de câncer. As 4-anilinoquinazolininas são úteis como inibidores reversíveis dessa tirosina quinase, tal como o composto Iressa **46** (**Figura 27**).²³⁰ Ao investigar o efeito da introdução de unidades B(OH)₂ no anel aromático da 4-anilinoquinazolinina (**Figura 27**), o grupo de Nakamura²³⁰

verificou que o crescimento das células de câncer foi inibido por meio do aprisionamento do ciclo celular G1, com consequente indução de apoptose. O composto **47** (**Figura 27**) inibiu a fosforilação da EGFR mediada por EGF com um tempo de ação prolongado de 5 h após a lavagem celular. Com base em estudos de *docking* molecular, atribuiu-se a atividade anticâncer prolongada à formação de uma ligação covalente B-O entre o resíduo de ácido aspártico 800 e o boro.

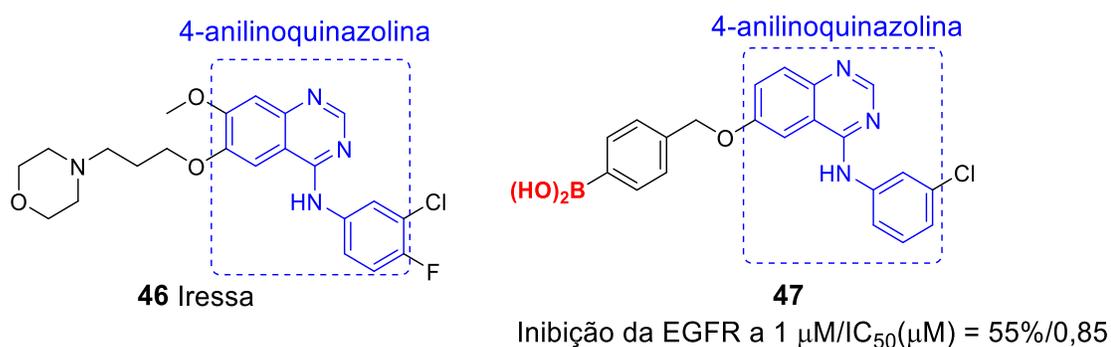
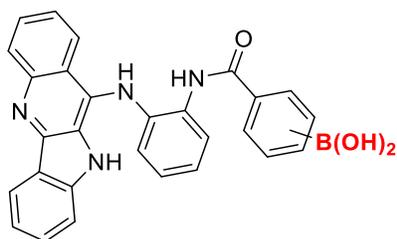


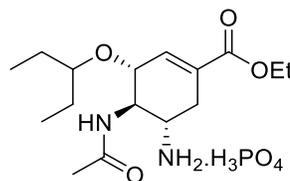
Figura 27 - Ácido arilborônico inibidor de EGFR²³⁰

A influenza A (IAV) é uma doença viral, a qual é ameaçadora principalmente para pessoas idosas, crianças e indivíduos imunocomprometidos devido, por exemplo, a doenças crônicas. Wang e colaboradores²³¹ sintetizaram borono quindolinas e avaliaram-nas frente ao vírus da influenza A (IAV), tendo verificado que os borono derivados **48a** e **48b** (**Figura 28**) não somente evitaram o acesso dos vírus ao núcleo celular, como também diminuíram a quantidade de vírus nas células infectadas. O fosfato de oseltamivir **49** é um inibidor de neuraminidases virais empregado correntemente na terapia da influenza. Em ensaios com cobaias vivas, Wang e colaboradores verificaram que a taxa de sobrevivência era maior para os animais tratados com **48b** do que para os animais tratados com o oseltamivir. O bloqueio da infecção por IAV com o composto de boro **48b** ocorre através de um espectro amplo de ação, pois o mesmo, além de inibir neuraminidase, inibe as vias de sinalização NF- κ B (fator nuclear kappa B) e MAPK (“*mitogen-activated protein kinases*” = proteínas quinases ativadas por mitógenos).²³¹



48a: 4-B(OH)₂ (IC₅₀ H1N1= 7,4 μM)

48b: 3-B(OH)₂ (IC₅₀ H1N1= 2,5 μM)



49 Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®)
(IC₅₀ H1N1= 9,5 μM)

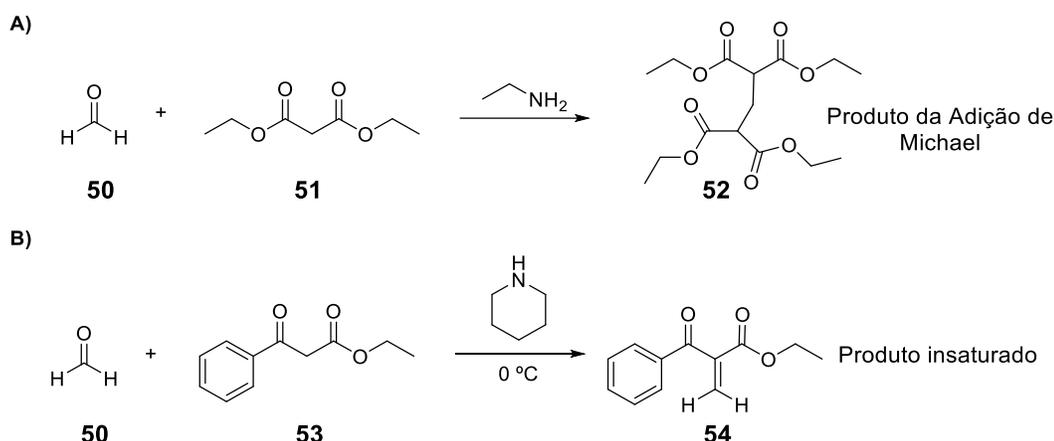
Figura 28 - Ácidos borônicos de quinodolinas avaliados para o vírus da influenza A²³¹

A partir de estudos da literatura, como aqueles relatados anteriormente, pode-se observar que a introdução de unidades B(OH)₂ na estrutura de inibidores pode ser uma estratégia interessante no *design* de fármacos.

1.5. Condensação de Knoevenagel

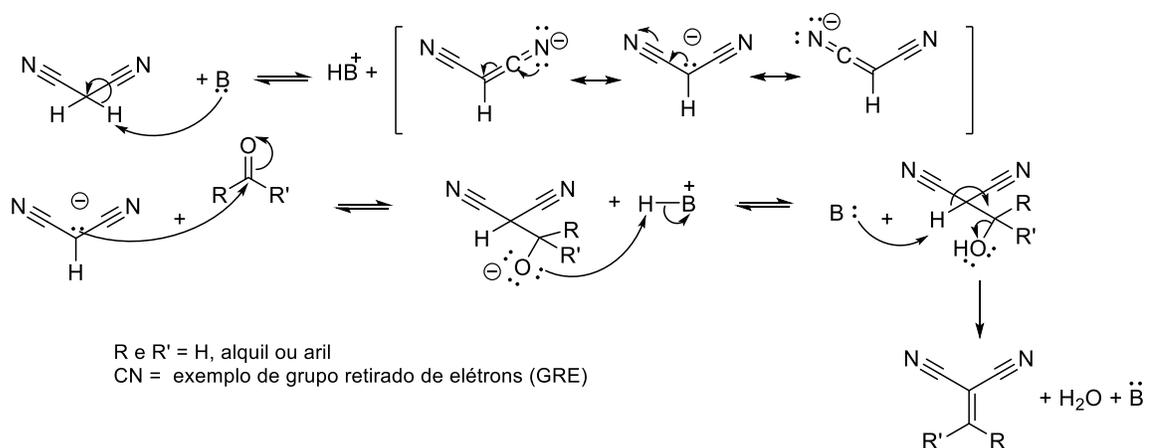
A reação de condensação de Knoevenagel foi relatada pela primeira vez em 1894 pelo químico alemão Emil Knoevenagel. O primeiro artigo sobre essa reação descreve a condensação entre o formaldeído **50** e o metileno ativo, malonato de dietila **51**, dando origem ao aduto *bis* **52** (**Esquema 9 A**). Essa reação foi realizada na presença de etilamina como catalisador.²³²

Em estudos posteriores empregando o benzoilacetato de etila **53** em reação com o formaldeído **50** na presença de piperidina a 0 °C, somente verificou-se a formação do produto insaturado **54** (**Esquema 9 B**). Os estudos de E. Knoevenagel o levaram a concluir que o produto primário da reação é um composto insaturado e que a formação do “produto bis” depende das condições de reação. Esse produto provém da adição de Michael do composto nucleofílico (malonato de dietila ou benzoilacetato de etila, para utilizar os exemplos anteriores) sobre o produto insaturado. O desenvolvimento desta reação por E. Knoevenagel levou à seguinte generalização: trata-se da condensação de β-cetoésteres ou malonatos com aldeídos e cetonas sob catálise de amins primárias e secundárias, ou ainda de seus sais.²³²



Esquema 9 - Primeira reação de condensação de Knoevenagel

Atualmente, a reação conhecida como condensação de Knoevenagel é a reação entre um metileno ativo (composto com unidade CH_2 formada de H's ácidos) e aldeídos/cetonas na presença de uma base fraca para formar um composto α,β -insaturado. Neste tipo de reação, o aldeído ou cetona sofre adição nucleofílica de um nucleófilo de carbono, com posterior desidratação (**Esquema 10**). Em meio básico, o nucleófilo de carbono (metileno ativo) é um enolato ou análogo e, em meio neutro ou ácido, esse nucleófilo é um enol ou análogo (**Figura 29**).



Esquema 10 - Esquema de intermediários da reação de Knoevenagel em meio básico

Por serem melhores eletrófilos, os aldeídos reagem muito mais rapidamente que as cetonas. Já a ativação do metileno ativo **55** é consequência da ligação direta a um grupo

retirador de elétrons (GRE) como o nitro, ciano, acila, entre outros, e na maioria dos casos, faz-se necessária a presença de dois grupamentos retiradores de elétrons (**Figura 29**). A presença de grupos GRE torna os hidrogênios-alfa ácidos, possibilitando a formação de um nucleófilo melhor. Isso acontece devido aos efeitos estabilizadores que atuam na base conjugada negativa (carbânion): efeito indutivo retirador de elétrons do grupo GRE e efeito mesomérico, já que, normalmente, o GRE, é, também, um retirador de elétrons por efeito mesomérico (**Esquema 10**). Exemplos típicos de metilenos ativos são malonato de etila **56**, cianoacetato de etila **57**, malononitrila **58** ou acetilacetona **59**.²³² Dentre os exemplos citados, a malononitrila **58** possui o metileno com hidrogênio mais ácido (pKa = 11,1) sendo, portanto, mais reativa frente a um eletrófilo (**Figura 29**). Além disso, a natureza do catalisador e do solvente são importantes para obtenção do produto desejado com bons rendimentos. Tradicionalmente, utilizam-se solventes orgânicos tóxicos como o tolueno e catalisadores básicos como a piridina e a piperidina.²³³

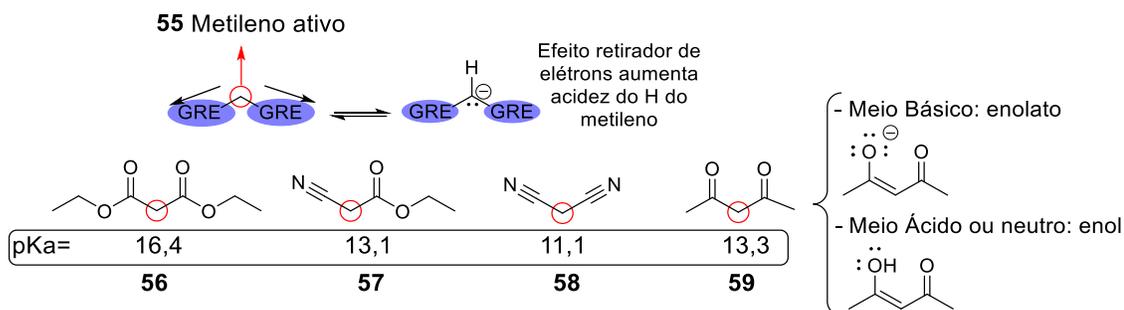
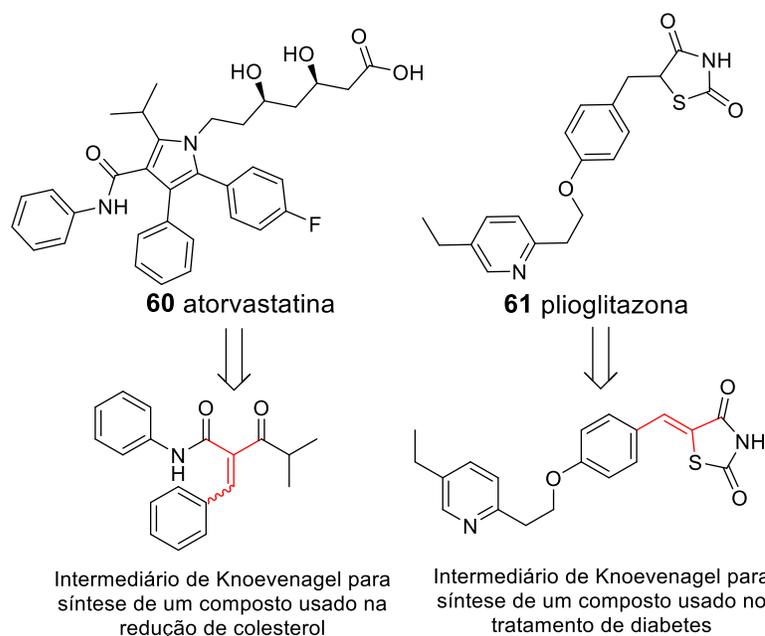


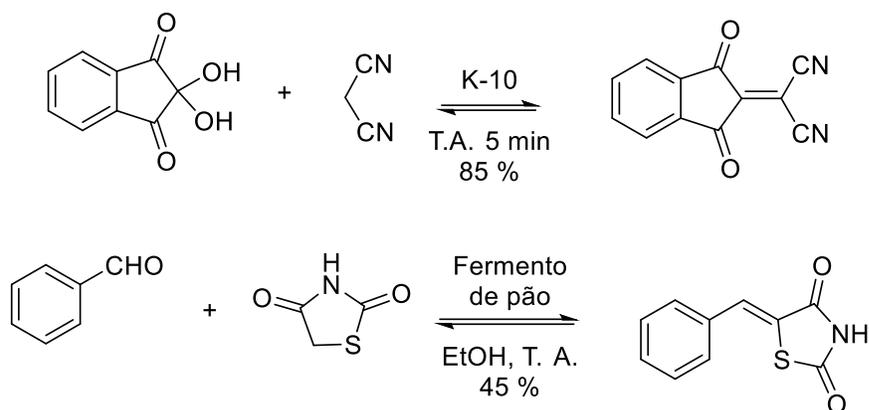
Figura 29 - Ativação do metileno por grupos retiradores de elétrons (GRE), exemplos de metilenos ativos²³²

Em razão de sua simplicidade, condições moderadas, versatilidade e economia atômica, a condensação de Knoevenagel tornou-se uma das metodologias mais empregadas para formação de ligações C=C. Os compostos α,β -insaturados obtidos através dessa reação são intermediários-chaves para obtenção de diversos produtos naturais, fármacos, polímeros, cosméticos e perfumes.²³⁴ Por exemplo, a reação de Knoevenagel é uma das etapas na produção de atorvastatina²³⁵ **60** e da pioglitazona²³⁶ **61** (**Esquema 11**).



Esquema 11 - Utilização da condensação de Knoevenagel para síntese de compostos com importância farmacêutica

Com o advento da Química Verde, a química orgânica clássica tem sido modificada com o objetivo de tornar os produtos e processos industriais mais sustentáveis. Alguns dos princípios estabelecidos são: prevenção de resíduos, economia atômica, produtos e processos mais seguros, eficiência energética, solventes atóxicos, mais seguros e menos poluentes, entre outros.²³⁷ Conseqüentemente, muitas reações clássicas, como a condensação de Knoevenagel foram adaptadas para essa nova realidade. Na literatura, é possível encontrar diversas metodologias alternativas para essa reação. O uso de irradiação de micro-ondas pode reduzir significativamente o tempo de reação, e, em muitos casos, aumenta o rendimento sem a necessidade de utilização de solventes.²³⁸ Diferentes compostos foram sintetizados utilizando essa metodologia.²³⁸ A utilização de catalisadores alternativos como a argila (montmorillonita K-10) e o fermento de pão (levedura), por exemplo, também já foi relatada por Chakrabarty²³⁹ e Pratap,²⁴⁰ respectivamente (**Esquema 12**).



Esquema 12 - Catalisadores ambientalmente benignos

Um dos grandes problemas da reação clássica de Knoevenagel é a utilização de solventes tóxicos. Portanto, metodologias sem solvente são bastante interessantes e há muitos relatos da aplicação desta abordagem à reação de Knoevenagel. Diferentes metodologias sem a necessidade de utilização de solventes já foram relatadas. Entretanto, essas metodologias, na maioria dos casos, não podem ser generalizadas para uma grande quantidade de reagentes.²⁴¹

Líquidos iônicos (LI), como o nitrato de etilamônio, também tem ganhado espaço como solventes e catalisadores na química verde em razão de suas propriedades únicas tais como, baixa viscosidade e pressão de vapor, e alta estabilidade térmica e química.²⁴²

A reação com solventes atóxicos, como a água, é uma alternativa viável para a reação de condensação de Knoevenagel como já relatado em diferentes artigos.²⁴³ A água além de ser atóxica e não-inflamável, é barata, facilmente acessível e possui propriedades que podem facilitar a reação. Na maioria dos casos, a água é um bom solvente apenas para compostos contendo um grupamento polar, sendo seu uso, portanto, restrito na química orgânica sintética. Entretanto, existem relatos na literatura que apesar dessa característica ser considerada, a princípio, negativa, a presença da água pode acelerar determinadas reações, aumentar ou diminuir rendimentos e/ou aumentar ou inverter seletividade de reações. As reações onde os reagentes se encontram em suspensão na água são chamadas de “*on water reactions*”. Outros inconvenientes que restringem o uso da água na química orgânica são a incompatibilidade dos intermediários com a água e a competição das reações desejadas com processos de hidrólise dos reagentes. Por outro

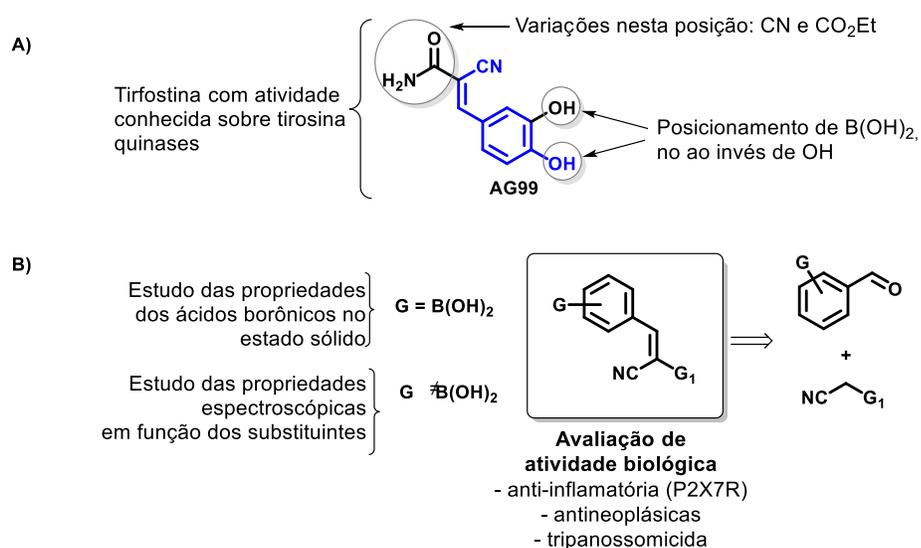
lado, a alta polaridade da água, sua capacidade de solvatação de íons e de formar ligações de hidrogênio, além de seu efeito hidrofóbico (agregação de moléculas apolares dissolvidas) tornam a água um excelente solvente alternativo para diversas reações, tais como: rearranjo de Claisen, condensação aldólica, reações tipo Michael, entre outras.²⁴⁴

Além disso, em muitos casos relatados na literatura em que a água foi utilizada como solvente, não houve a necessidade de catalisadores. Portanto, essa foi a abordagem escolhida para o presente trabalho: utilização de água como solvente, sem o uso de catalisadores.

2. ESTRATÉGIAS EMPREGADAS

Conforme abordado anteriormente (Seção 1.4.1), alguns grupos empregaram a estratégia de trocar a hidroxila de esqueletos comuns a estruturas químicas cujas atividades almejadas já estavam bem estabelecidas por unidades $B(OH)_2$. Desta forma, no que diz respeito à parte deste trabalho referente à Química Medicinal, seguiu-se a abordagem na qual as tirfostinas, como aquelas dos trabalhos pioneiros de Levitzki (**Figura 19**), foram empregadas como esqueletos-bases e as hidroxilas das posições 3 e 4 foram substituídas por grupos $B(OH)_2$ (**Esquema 13 A**). A atividade inibitória das tirfostinas sobre tirosinas quinases já está bem estabelecida na literatura (Seção 1.3.3).¹⁸⁶

Como estratégia sintética para obtenção das benzeno-vinilnitrilas, empregou-se a reação de Knoevenagel (Seção 1.5) entre aldeídos aromáticos e a malononitrila ou o cianoacetato de etila (**Esquema 13 B**). Foram preparadas tirfostinas onde a unidade $B(OH)_2$ estava presente (borono-tirfostinas) e também onde esta unidade estava ausente. Para tanto, foram empregados aldeídos aromáticos com diferentes substituintes no anel. A intenção foi de comparar as propriedades das borono-tirfostinas com aquelas dos compostos sem boro, tanto do ponto de vista biológico como de algumas propriedades químicas.



Esquema 13 - Estratégias adotadas no trabalho

3. OBJETIVOS

- Preparar benzeno-vinilnitrilas (tirfostinas) sem o boro e benzeno-vinilnitrilas contendo o grupo $B(OH)_2$ (borono-tirfostinas) por reações Knoevenagel (**Figura 30**).
- Estudar a influência dos diferentes grupos funcionais presentes nas benzeno-vinilnitrilas preparadas.
- Obter cristais e estudar as interações intermoleculares no estado cristalino dos ácidos borônicos (**Figura 30**, $G = B(OH)_2$) obtidos.
- Avaliar as atividades anticâncer, tripanocidas, anti-inflamatórias e a ação sobre o receptor P2X7 de humanos e de camundongo das benzeno-vinilnitrilas preparadas.

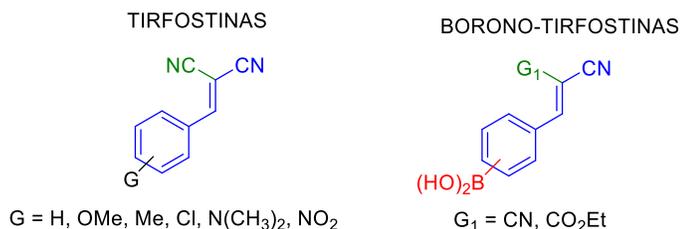


Figura 30 - Tirfostinas e borono-tirfostinas obtidas por condensação de Knoevenagel

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Preparo das benzeno-vinilnitrilas por condensação de Knoevenagel

A reação de condensação de Knoevenagel é uma ferramenta sintética muito utilizada para obter compostos α,β -insaturados (**Figura 30**). Essa estrutura é comumente encontrada em inibidores de tirosina quinase (tirfostinas)¹⁸⁶ e outros intermediários com importância química e biológica.^{235,236}

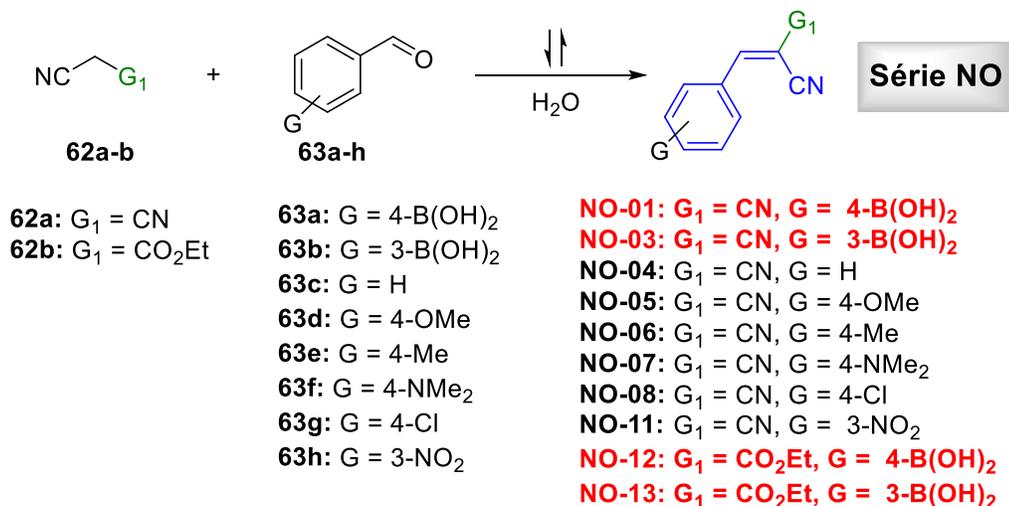
Apesar de existirem diferentes metodologias disponíveis na literatura para a reação de Knoevenagel,²⁴⁵ ela é usualmente realizada na presença de catalisadores como aminas fracamente básicas (alifáticas e aromáticas),²⁴⁶ sais de amônio²⁴⁷ ou hidróxidos de metais alcalinos em solventes orgânicos apróticos (DMF, piridina ou MeCN) que podem funcionar como solvente e como catalisador.²⁴⁸

Com o objetivo de tornar a química orgânica sintética mais “verde” e sustentável, muitos grupos de pesquisa têm se esforçado em desenvolver protocolos menos agressivos ao meio ambiente. Algumas das estratégias são: redução do uso de catalisadores ou utilização de biocatalisadores, economia atômica, métodos de aquecimento alternativos, redução ou eliminação do uso de solventes tóxicos, uso de solventes atóxicos e renováveis como a água.²⁴⁹

A aplicação de protocolos aquosos é desejável e tem ganhado atenção nas últimas décadas, uma vez que a água é um solvente não inflamável, atóxico, barato e facilmente disponível. Outra característica interessante da água é seu chamado “efeito hidrofóbico”, que, em muitos casos relatados na literatura, acelera a velocidade de reações orgânicas em sistemas aquosos.²⁵⁰ Adicionalmente, já foi demonstrado por Bigi e colaboradores que a água é um solvente interessante para a reação de condensação de Knoevenagel.^{243b}

No presente trabalho, benzeno-vinilnitrilas foram preparadas por condensação de Knoevenagel entre aldeídos aromáticos e nitrilas contendo um metileno ativo (**Esquema 14**) em meio aquoso.²⁵¹ As benzeno-vinilnitrilas contendo a porção borono (ácidos arilborônicos) foram sintetizadas a partir dos ácidos formilfenilborônicos comerciais correspondentes. Apesar dos ácidos borônicos serem o foco deste trabalho, outras benzeno-vinilnitrilas, sem o boro, foram sintetizadas para que fosse possível avaliar a

importância do grupamento B(OH)₂ na atividade biológica e o efeito dessa porção nas propriedades das benzeno-vinilnitrilas.



Esquema 14 - Benzeno-vinilnitrilas por condensação de Knoevenagel em água

Os compostos foram sintetizados de acordo com os princípios da química verde, sem a utilização de catalisadores e solventes orgânicos tanto na reação, quanto no isolamento. Isso porque os produtos de reação não eram solúveis no meio aquoso e precipitaram, de forma que o isolamento consistiu em uma filtração seguida de lavagem com água. Empregando um protocolo aquoso eficiente e ambientalmente benigno, os produtos foram obtidos com elevado rendimento ($\geq 85\%$) e grau de pureza ($\geq 98\%$, aldeído é o único contaminante).

Apesar do aquecimento em refluxo e da presença de ar na reação, não houve degradação dos reagentes nem quebra da ligação C-B dos ácidos formilfenilborônicos de partida ou dos produtos. Os aldeídos não foram oxidados ao ácido carboxílico correspondente e não foi observada hidrólise do éster etílico nas condições reacionais utilizadas. De fato, as condições empregadas, refluxo de água, ausência de catalisador ácido e reações de até 6 horas, podem não ser capazes de oxidar o aldeído a ácido carboxílico.

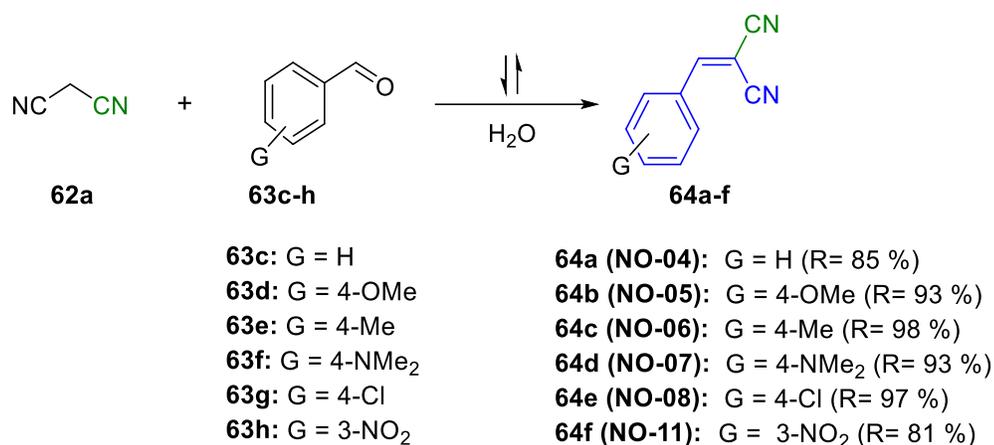
Apesar de protocolos aquosos já terem sido relatados na literatura para a reação de Knoevenagel, é importante ressaltar que esta condição não havia sido avaliada para

aldeídos contendo a unidade $B(OH)_2$. A preocupação inicial de se utilizar esse protocolo era a protodesboronação (quebra de ligação C-B).²⁵² Em determinadas condições, com forte influência do pH, a presença de água promove a quebra da ligação C-B de ácidos borônicos formando produtos indesejáveis e diminuindo o rendimento da reação.²⁵³ Entretanto, os produtos foram obtidos com bons rendimentos e não foi detectado nenhum produto de desboronação ao utilizar-se o protocolo aquoso na reação de Knoevenagel com a malononitrila e com o cianoacetato de etila.

Um cenário bem diferente do que normalmente ocorre em reações de Knoevenagel sob condições clássicas, com solventes e bases orgânicas, onde se fazem necessários isolamentos trabalhosos. Essa metodologia de isolamento é extremamente conveniente, pois os compostos sintetizados possuem uma unidade $B(OH)_2$ bastante polar, que fica retida na sílica de colunas cromatográficas. Além disso, boroxinas (anidridos oligoméricos produzidos por desidratação) podem se formar na presença de solventes orgânicos como tolueno e acetonitrila sob refluxo, ou no processo de retirada desses solventes por destilação. Portanto, o protocolo aquoso utilizado resultou apenas nos ácidos borônicos em vez dos anidridos correspondentes. Não foi necessária a utilização de excesso de nenhum reagente. Aliás, o excesso de malononitrila, gerou um subproduto não identificado amarelo de difícil remoção por recristalização.

4.1.1. Benzeno-vinilnitrilas sem o boro (64a-f)

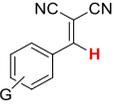
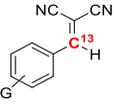
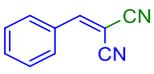
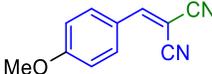
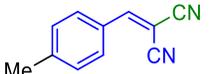
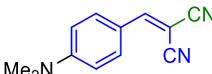
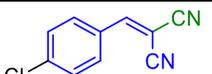
Inicialmente, foram sintetizadas apenas vinilnitrilas derivadas da malononitrila, sem o boro. Esta síntese foi realizada através da reação de Knoevenagel entre diversos aldeídos aromáticos e a malononitrila (**Esquema 15**), gerando uma classe de compostos conhecidos na literatura como ilidenomalononitrilas.²⁵⁴ Apesar de já serem relatados, todos os produtos tiveram seus pontos de fusão determinados e comparados com a literatura e foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho, ressonância magnética nuclear (RMN) de 1H e ^{13}C .



Esquema 15 - Obtenção de benzeno-vinilnitrilas sem boro

As benzeno-vinilnitrilas derivadas da malononitrila foram isoladas por filtração à vácuo e, na maior parte dos casos, obtidas como sólidos com bom grau de pureza. Nos casos em que ainda havia traços de aldeído (1-2%), realizou-se recristalização com acetona e água. Na **tabela 11**, tem-se a relação das moléculas sintetizadas, dos rendimentos de reação, pontos de fusão e algumas informações dos espectros de infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e de ¹³C.

Tabela 11 - Benzeno-vinilnitrila sintetizadas

Produto	Produto (Estrutura)	R* (%)	ν_{CN} (cm^{-1})	δ (ppm) ^1H -RMN 	δ (ppm) ^{13}C -RMN 	PF ($^{\circ}\text{C}$)*
64a (NO-04)		85	2223	7,780	160,0	82 - 84
64b (NO-05)		93	2224	7,652	158,9	116 - 118
64c (NO-06)		98	2225	7,720	159,8	136 - 137
64d (NO-07)		93	2210	7,458	158,0	185 - 188
64e (NO-08)		97	2226	7,732	158,3	167 - 169
64f (NO-11)		81	2228; 2226	7,893	157,1	104 - 106

* Média em triplicata

De uma maneira geral, obtiveram-se altos rendimentos ($R \geq 90\%$) após isolamento, excetuando-se os compostos **64a** (Ph, $R = 85\%$) e **64f** (3- NO_2 , $R = 81\%$), como podemos observar na **Tabela 11**.

A espectroscopia na região do infravermelho é importante em síntese orgânica para identificar mudanças de grupos funcionais que possuem bandas características, como ocorre no caso das benzeno-vinilnitrilas. Na análise dos produtos da reação de Knoevenagel entre aldeídos e nitrilas com metilenos ativos, espera-se observar o desaparecimento de uma banda característica de aldeído ($\text{C}=\text{O}$ e $\text{O}-\text{H}$) e o aparecimento de uma banda de nitrila ($\text{C}\equiv\text{N}$) conjugada ($\text{C}=\text{C}-\text{C}\equiv\text{N}$). Dessa forma, é possível verificar se de fato um produto foi formado, ou não. Bandas de nitrilas saturadas ou, insaturadas sem conjugação entre a nitrila e o grupo olefínico apresentam bandas de estiramento axial em torno de $2250 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$. Já na presença de conjugação essa banda

se desloca para $2225 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$. O composto **64a**, por não possuir nenhum substituinte no anel aromático, será considerado, nesse caso, o padrão para a banda de estiramento axial (ν) de $\text{C}\equiv\text{N}$ para fins de comparação. Pode-se observar que todos os compostos com exceção do **64d** (4-NMe₂) contendo uma amina terciária na posição *para*, apresentaram um aumento no número de onda do $\nu\text{C}\equiv\text{N}$. Esse aumento sugere o fortalecimento da ligação $\text{C}\equiv\text{N}$ em resposta a um efeito retirador de elétrons (Cl e NO₂), ou doador fraco dos substituintes (MeO e Me). Por outro lado, o composto **64d** apresenta um enfraquecimento da ligação. Esse enfraquecimento em comparação com o composto **64a** é resultante da doação mais efetiva dos elétrons n do nitrogênio o que gera o híbrido de ressonância da **figura 31**. Como se pode ver, a tripla ligação fica com um caráter intermediário entre dupla e tripla, resultando em uma menor energia para realizar o estiramento, por isso a vibração ocorre em menor número de onda (**64d**: 2210 cm^{-1} versus **64a**: 2223 cm^{-1}). Essas observações demonstram a sensibilidade da ligação $\text{C}\equiv\text{N}$ à mudanças de substituinte.

Outra mudança interessante que pode ser observada é o aparecimento de duas bandas de estiramento de nitrila apenas para o composto com o nitro **64f** como substituinte. Esse substituinte é retirador de elétrons por indução e por efeito mesomérico. As benzeno-vinilnitrilas analisadas possuem duas nitrilas em posição germinal uma em relação à outra. Portanto, é de se esperar o aparecimento de uma banda de estiramento assimétrica (movimento de estiramento dos cianos em direções opostas, um em relação ao outro), além da banda simétrica. Em um estudo de Raman publicado em 2020 por Saha e colaboradores,²⁵⁵ os compostos com 4-OH, 4-Cl e o sem substituinte, apresentaram duas bandas de nitrila, diferentemente do que foi observado por infravermelho no presente trabalho. Adicionalmente, foi relatada uma característica particular de moléculas com diciano germinais: dependendo do ângulo entre as duas nitrilas ($< 135^\circ$), a banda de estiramento simétrica ocorre em um número de onda maior do que a assimétrica. Portanto, é possível que, no composto (**64f**) que aparecem duas bandas de nitrila, a de maior número de onda (2228 cm^{-1}) seja do estiramento simétrico, e não do assimétrico, como esperado.

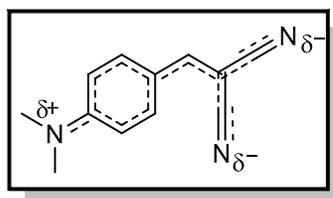


Figura 31- Híbrido de ressonância do composto **64d**

As vinilnitrilas obtidas por condensação de Knoevenagel foram ainda caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H . Novamente, tem-se como padrão o composto **64a**. Neste caso, observa-se que o deslocamento químico (δ) do hidrogênio vinílico é de 7,780 ppm (**Tabela 11**). O deslocamento químico fornece informações importantes acerca do tipo de hidrogênio analisado e de seu ambiente químico (rico ou pobre em elétrons). O hidrogênio aldeídico foi escolhido pois, após a reação, é o que tem seu ambiente químico mais alterado (H aldeídico para H vinílico). Em geral, observa-se que todos os compostos com substituintes no anel apresentam um menor deslocamento, o que significa que o mesmo hidrogênio, em diferentes compostos, encontra-se em um ambiente mais rico em elétrons do que o hidrogênio da molécula padrão. Sendo o H do composto contendo o grupamento 4-NMe₂ o mais blindado de todos. Apenas o **64f** (3-NO₂) apresentou um maior deslocamento, esta informação demonstra que o grupamento nitro na posição *meta* possui a capacidade de desblindar o núcleo do hidrogênio. Essa tendência não se manteve para o espectro de carbono 13, onde todos os carbonos vinílicos apresentaram um deslocamento químico menor (mais blindado) que o do composto padrão **64a**. Inclusive, o carbono vinílico do composto com nitro foi o mais blindado de todos. Os hidrogênios foram atribuídos aos seus respectivos carbonos com a ajuda dos espectros de APT e HSQC.

Através dos valores da **figura 32**, pode-se observar um deslocamento para o vermelho (batocrômico) dentro da série de compostos. Esta característica evidencia a presença de um sistema push-pull (doação-recepção), onde a nitrila é o grupamento receptor (**Figura 33**). Isto significa que, quanto maior a capacidade doador do grupamento ligado ao anel, menor será a energia necessária (maior comprimento de onda) para promover um elétron do orbital HOMO (n , não ligante) para o LUMO (π^*).

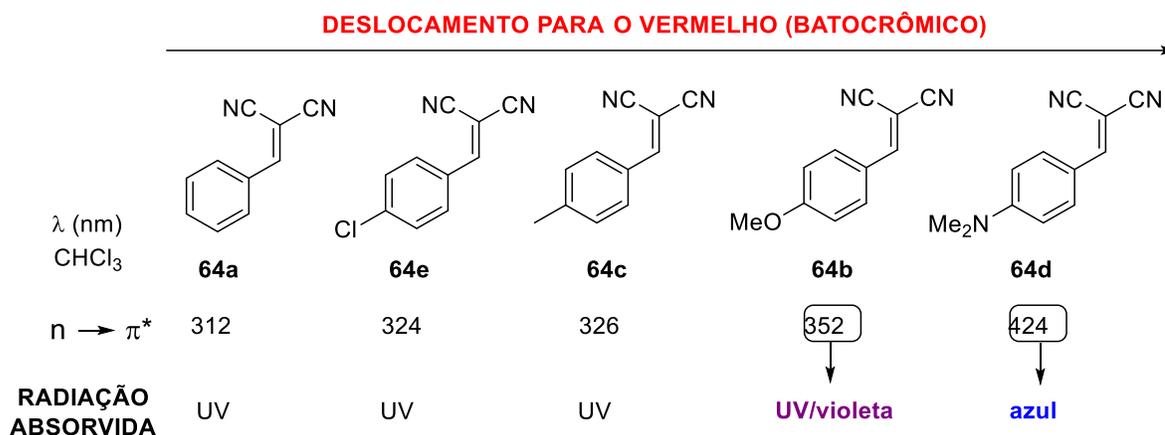


Figura 32 - Absorção e cores de algumas benzeno-vinilnitrilas no UV/vis

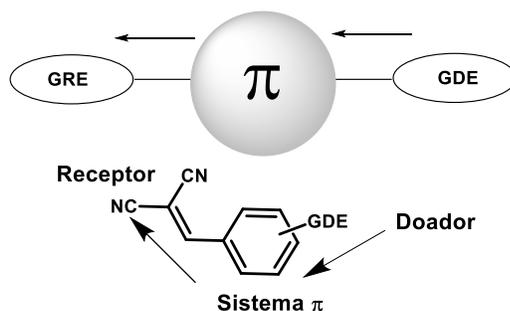


Figura 33 - Sistema *push-pull* (D- π -A)

O deslocamento batocrômico, na série de compostos da **figura 32**, reflete-se na coloração dos mesmos: aqueles que absorvem abaixo de 400 nm (luz violeta) são brancos. Quando a absorção se aproxima de 400 nm, a cor torna-se levemente amarelada. Por outro lado, quando o comprimento da absorção é superior a 400 nm, pode-se observar uma coloração bem mais intensa. Isto porque, trata-se de uma absorção da cor azul produzindo um sólido laranja (cor emitida). A série de cores pode ser observada na **figura 34**.

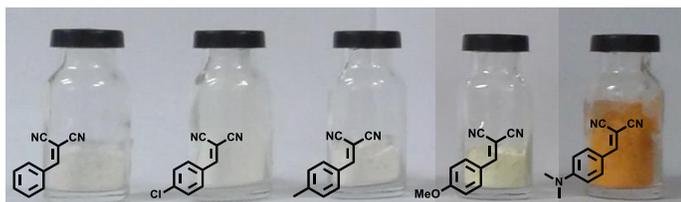
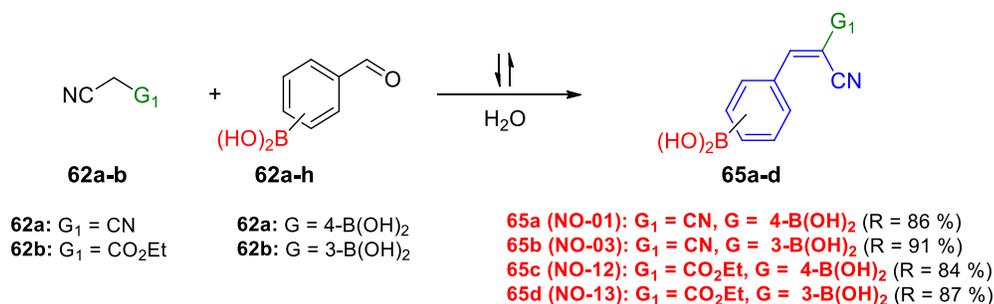


Figura 34 - Série de cores das benzeno-vinilnitrilas

O ponto de fusão, por ser uma constante física, pode ser utilizado para corroborar a identificação do produto desconhecido, principalmente nos casos em que a molécula alvo já foi descrita na literatura. Portanto, ao compararem-se os valores da literatura com os valores obtidos para o sólido em questão, tem-se um indício se o produto desejado foi obtido ou não, de forma rápida e sem o uso de técnicas sofisticadas. Além disso, o ponto de fusão permite fazer uma estimativa grosseira se o sólido analisado está puro ou não. Em geral, impurezas diminuem o ponto de fusão e ampliam a faixa de fusão. O ponto de fusão, quando utilizado para analisar a influência de diferentes substituintes, fornece informações sobre a força das interações intermoleculares envolvidas. Moléculas orgânicas aromáticas interagem entre si por interações de π -*Stacking* devido à presença de uma nuvem de elétrons π deslocalizada sob o anel. Portanto, todos os compostos sintetizados apresentam esse tipo de interação, entretanto, os pontos de fusão são bem variados. Isso ocorre, pois, a presença de substituintes no anel possibilita outros tipos de interações mais fortes. O composto **64a**, que apresenta só a fenila, tem o menor ponto de fusão (81-84°C), isso por que, a interação mais pronunciada nesse caso é a de π -*Stacking*. A presença de grupamentos capazes de gerar dipolo, aumenta o ponto de fusão, como no caso do 4-Cl (**64e**, 167-169 °C) que apresenta um ponto de fusão consideravelmente mais alto do que a molécula sem substituinte. O composto com maior ponto de fusão é aquele que contém a amina (**64d**, 185-188 °C). Nesse caso, como já visto na estrutura do híbrido de ressonância da **figura 31**, o nitrogênio da amina apresenta uma carga parcial positiva, gerando um dipolo bastante efetivo (momento de dipolo 5,535 Debye).²⁵⁶ Esta característica permite uma interação dipolo-dipolo mais intensa do que no restante das moléculas. O composto **64f** com a nitrila na posição *meta* apresenta o segundo menor ponto de fusão (104-106°C), apesar do substituinte nitro possuir uma carga positiva efetiva. Essa informação, apesar de parecer contraditória, está correta. A simetria da molécula possui forte influência no valor do ponto de fusão. Quanto mais simétrica a estrutura, mais as moléculas aproximam-se e maior a energia das interações intermoleculares. Se as moléculas não são capazes de se aproximar e interagir efetivamente, a força ou energia dessa interação diminui e, portanto, a energia necessária para quebra-las é menor.

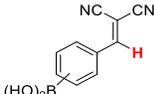
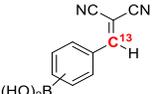
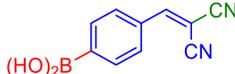
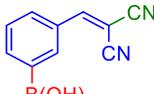
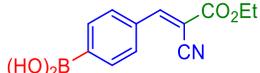
4.1.2. Benzeno-vinilnitrilas contendo a porção borono (ácidos borônicos, **65a-d**)

Após a síntese dos compostos derivados de malononitrilas, sintetizaram-se, a partir da condensação de Knoevenagel, outras benzeno-vinilnitrilas inéditas, estas contendo a porção borono, de acordo com o **esquema 16**. Os produtos foram caracterizados também para que suas propriedades no estado sólido fossem analisadas. Na **tabela 12**, tem-se a relação das moléculas sintetizadas, dos rendimentos de reação e algumas informações dos espectros de infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C .



Esquema 16 - Obtenção de ácidos borônicos

Tabela 12 - Benzeno vinilnitrilas contendo a porção borono (borono-tirfostinas) sintetizadas

Produto	Produto (Estrutura)	R* (%)	ν_{CN} (cm^{-1})	δ (ppm) ^1H -RMN 	δ (ppm) ^{13}C -RMN 
65a (NO-01)		86	2247,3; 2228	8,484	161,5
65b (NO-03)		91	2242,9; 2225	8,505	162,0
65c (NO-12)		84	2226	8,383	161,7
65d (NO-13)		87	2237,3	8,347	161,8

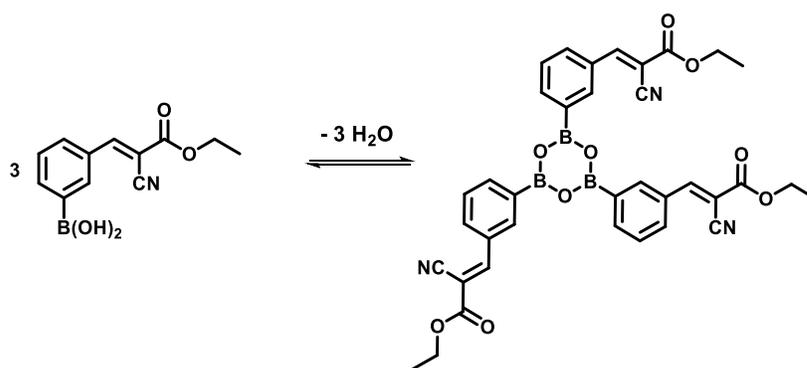
*Média em triplicata

As benzeno-vinilnitrilas com boro derivadas de malononitrila (**65a** e **65b**) e de cianoacetato de etila (**65c** e **65d**) foram isoladas por filtração à vácuo e, na maior parte dos casos, obtidas como sólidos brancos com bons rendimentos ($R \geq 80\%$) e grau de pureza ($\geq 98\%$). Em razão da similaridade entre as solubilidades do aldeído e de seu produto; da proximidade entre os fatores de retenção; e da alta retenção de compostos com $\text{B}(\text{OH})_2$ em sílica de colunas cromatográficas, a separação dos produtos contendo boro de seus respectivos aldeídos para teste biológico (pureza necessária $> 99\%$) é particularmente difícil. Em alguns casos, após o isolamento e a análise de RMN, foi constatada a presença de 1% de aldeído que deveria ser removido para realizar os testes biológicos sem interferências. Foram testadas algumas estratégias para retirada do contaminante. A primeira tentativa foi a recristalização utilizando água/etanol; água/acetona e água/metanol, em algumas tentativas com a mistura água/etanol foi possível retirar o aldeído restante (1%), entretanto, algumas vezes o mesmo

procedimento não funcionava. Em busca de uma metodologia mais consistente e com menos perdas de produto, retornou-se o produto para o balão de reação e adicionou-se mais do metileno ativo necessário (malononitrila ou cianoacetato de etila). Após o segundo isolamento, porém, não foi possível retirar o aldeído residual. Uma outra estratégia adotada foi a de oxidação do aldeído com bissulfito de sódio ou metabissulfito de sódio em um ácido hidroximetanossulfônico (AHMS).²⁵⁷ Esperava-se que a formação desse ácido facilitasse a separação. Entretanto, em todas as metodologias adotadas (lavagem ou extração) a massa do produto reduzia significativamente, e não era possível recuperá-la. Argüello e colaboradores, publicaram em 2019 um artigo em que relatam a transformação de ácidos arilborônicos em fenóis intermediada por um agente redutor, o sulfito de sódio, na presença de oxigênio molecular. Portanto, é possível que ao lavar os produtos, não só o aldeído fosse oxidado. Havendo formação de fenóis, justificando a redução de massa e impossibilidade de recuperar o produto sólido.²⁵⁸ Uma vez que todas as tentativas de remover o aldeído através de reações para transformá-lo em outra substância falhou, optou-se por purificar por meio de recristalizações sucessivas.

Os valores de pontos de fusão capilar não aparecem na tabela, pois, apesar da análise ter sido realizada, não foram determinados com precisão. Os ácidos borônicos possuem uma característica particular de formarem anidridos (boroxinas) sob aquecimento, dificultando a determinação do ponto de fusão pela liberação de água.^{200c} Dessa forma, o ponto de fusão observado pode ser do anidrido e não do produto inicial. Além disso, compostos com boro são utilizados como retardantes de chama²⁵⁹ e, portanto, possuem elevado ponto de fusão, fazendo com que seja improvável a determinação do ponto de fusão capilar em aparelhos comumente encontrados em laboratório (temperatura máxima de 300 °C). Quanto aos ácidos borônicos preparados no presente trabalho, foram obtidos pontos de decomposição e não de fusão. Análises térmicas estão sendo realizadas a fim de avaliar o comportamento térmico desses compostos. O resultado preliminar da análise térmica do compostos **64d**, demonstra três eventos térmicos independentes. Dois, desses três, estão associados com mudança de massa. O primeiro evento ocorre na faixa de 107-147 °C onde se verifica a desidratação e ciclização das moléculas (**Esquema 17**), já no segundo evento entre 199-229 °C, ocorrem, possivelmente rearranjos internos ou processos de fusão. No último evento

(230-525 °C) ocorre a carbonização e formação do resíduo B₂O₃. Os pontos de fusão dos aldeídos de partida **63a** e **63b** também variam de acordo com a literatura pesquisada. Em um artigo o composto **63a** apresenta faixa de fusão entre 235-237 °C^{200d}, em outro 240 °C^{200e}, já no site da Sigma Aldrich a faixa relatada é bem larga 237-247 °C. Já para o composto *meta* substituído **63b**, a faixa de ponto de fusão encontrada no site da Sigma-Aldrich é 109-113 °C.²⁰⁰



Esquema 17 - Processo de desidratação e ciclização do composto **65d**

Através do espectro é possível ter uma noção sobre o consumo do aldeído e formação de uma nitrila conjugada. Para isso, observou-se a presença ou ausência da banda de estiramento $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ e de $\nu\text{C}=\text{O}$. De acordo com os dados da literatura²⁶⁰ espera-se uma banda de intensidade média para $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ na faixa de 2.273 - 2.000 cm^{-1} . O valor da banda depende da estrutura da molécula (substituintes e conjugação). Por exemplo, a presença de substituintes doadores de elétrons, como no caso do dimetilamino, aumentam o comprimento da ligação e diminuem a constante de força. Dessa forma, é necessária uma energia menor para o estiramento da ligação. O contrário ocorre com grupamentos que atraem elétrons, como no caso do cloro. Já a conjugação da nitrila pela presença de uma insaturação adjacente pode reduzir a frequência de absorção (maior comprimento de onda, menor número de onda) e pode aumentar a intensidade da banda (**Figura 35**).²⁶¹ Como este tipo de deformação não aparece nos espectros dos aldeídos de partida (**Figura 36**) é possível inferir a formação de uma nova ligação. Em comparação com os metilenos ativos utilizados, as borono-trifostinas sintetizadas apresentam valores de $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ menores (2247-2225 cm^{-1}) do que o observado no espectro da malononitrila (2274

cm^{-1}) e do cianoacetato de etila (2266 cm^{-1}). Essa diferença entre o estiramento da nitrila observado nos reagentes de partida e o observado nos espectros dos produtos obtidos, sugere a formação de uma nova ligação.

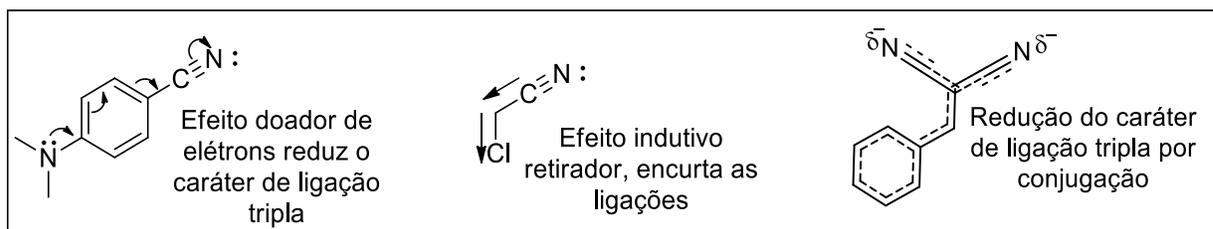


Figura 35 - Efeitos que influenciam o valor de estiramento axial das nitrilas

A banda característica de $\nu\text{C}\equiv\text{N}$, existente nos espectros dos ácidos borônicos (**65a**: $\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2247 \text{ cm}^{-1}$; 2228 cm^{-1} , **65b**: $\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2243 \text{ cm}^{-1}$; 2225 cm^{-1} , **65c**: $\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2226 \text{ cm}^{-1}$, **65d**: $\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2237 \text{ cm}^{-1}$) obtidos, apresentou valores de número de onda maiores do que o observado na benzeno-vinilnitrila padrão **64a** ($G = H$) sem substituinte (**64a**: $\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2223 \text{ cm}^{-1}$). O composto **65c**, derivado de cianoacetato de etila com a porção borono na posição *para*, foi aquele que apresentou um valor mais próximo de $\nu\text{C}\equiv\text{N}$ (**65c** = 2226 cm^{-1}) ao da molécula **64a** (**64a** = 2223 cm^{-1}). Portanto, esse composto possui a ligação tripla nitrílica mais enfraquecida da série de ácidos borônicos. A diferença entre os valores obtidos (**64a**: $\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2223 \text{ cm}^{-1}$ e **65a**: $\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2247 \text{ cm}^{-1}$) na série sem o boro e na série com o boro é impressionante. As moléculas **65a** e **65b** derivadas de malononitrila possuem a ligação tripla mais fortalecida da série, já que estas possuem os dois maiores número de onda. Seus valores se assemelham àqueles encontrados em nitrilas saturadas ou, nas insaturadas não conjugadas ($\nu\text{C}\equiv\text{N} = 2250 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$). Dessa forma, é possível deduzir que a unidade $\text{B}(\text{OH})_2$ funciona como um grupamento retirador de elétrons. Outra evidência desse caráter retirador é a presença duas bandas de estiramento de nitrila, observada nos compostos derivados de malononitrila contendo boro (**65a** e **65b**). Essa característica também é encontrada na benzeno-vinilnitrila com o grupamento nitro (**64f**).

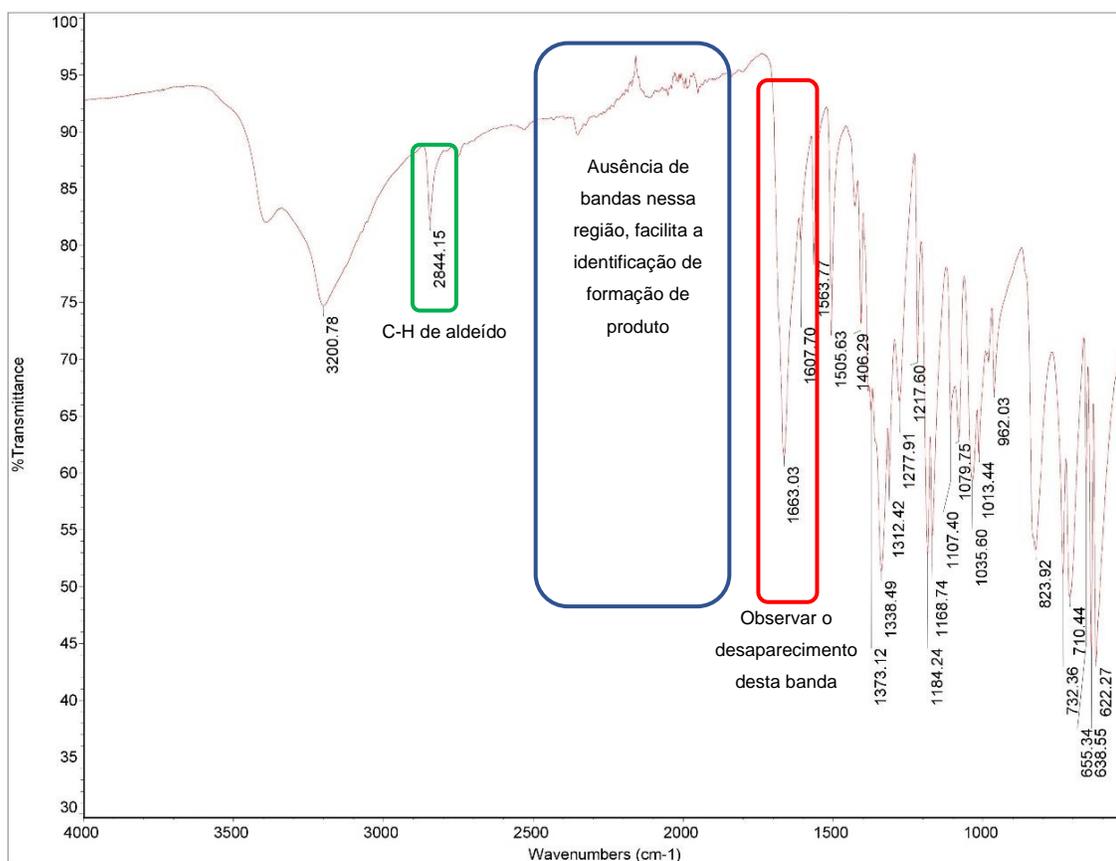


Figura 36- Espectro de IV do aldeído de partida ácido 4-formilfenilborônico (**63a**)

No caso dos derivados de cianoacetato de etila (**65c** e **65d**), além do aparecimento da banda de nitrila, observa-se o aparecimento de uma banda de intensidade forte característica de C=O de ésteres ($1750\text{-}1735\text{ cm}^{-1}$, faixa para ésteres alifáticos sem conjugação).²⁶¹ A faixa de aparecimento de C=O de éster é diferente daquela observada em aldeídos ($1740\text{-}1725\text{ cm}^{-1}$, faixa para aldeídos alifáticos sem conjugação),²⁶¹ permitindo assim sua diferenciação. A ligação C=O de éster apresenta valores de números de onda maiores, portanto esta ligação encontra-se fortalecida em comparação com a do aldeído. Esse fenômeno é resultado da presença de um átomo eletronegativo (oxigênio) adjacente ao carbono da carbonila (efeito indutivo retirador de elétrons), que acaba por encurtar (fortalecer) a ligação (**Figura 37**). Como resultado, têm-se bandas com maiores frequências. Outro efeito importante a ser considerado é o da conjugação. Todas as moléculas sintetizadas são compostos α,β -insaturados, no caso dos compostos

65c e **65d** esta insaturação está conjugada com o éster. A introdução de uma ligação dupla adjacente a uma carbonila resulta na deslocalização dos elétrons π entre as ligações C=C e C=O. Portanto, a conjugação aumenta o caráter de ligação simples, como pode ser visto no híbrido de ressonância na **figura 37**. O aumento do caráter de ligação simples reduz a constante de força e, conseqüentemente, o número de onda da absorção. Em geral, a introdução de uma insaturação α , β reduz a frequência da ligação C=O em 15-45 cm^{-1} (faixa de ésteres α , β -insaturados 1740-1715 cm^{-1}) e da ligação C=C em 10 cm^{-1} .²⁶¹

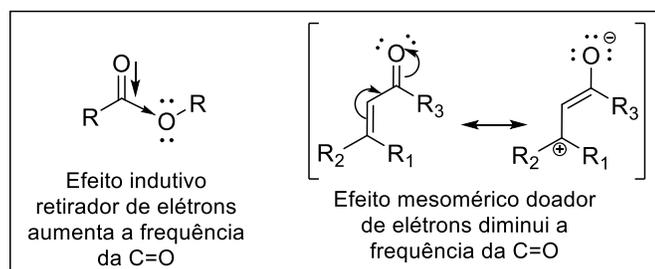


Figura 37 - Efeitos que alteram a frequência da ligação C=O de ésteres

Nos compostos derivados de cianoacetato de etila, a ligação C=O é conjugada com uma ligação dupla, que por sua vez, é conjugada com um anel aromático, por isso, espera-se que os valores de absorção dessa ligação sejam baixos (**Figura 38**). Para os compostos sintetizados, o efeito da conjugação (diminuição da frequência) prevalece sobre o efeito indutivo (aumento da frequência), **65c** $\nu_{\text{C=O}} = 1710 \text{ cm}^{-1}$ e **65d** $\nu_{\text{C=O}} = 1720 \text{ cm}^{-1}$. É interessante notar que, para os compostos **65c** e **65d**, a unidade B(OH)₂ na posição *meta* fortalece as ligações C \equiv N e C=O. Já para os compostos **65a** e **65b**, a posição da unidade B(OH)₂ não parece afetar significativamente a força da ligação C \equiv N.

Outra modificação importante e de fácil identificação no espectro de IV é o desaparecimento da banda de estiramento característica de carbonila de aldeído conjugado (1700-1680 cm^{-1}).²⁶¹ Após a reação de Knoevenagel, há a transformação do grupo funcional aldeído em uma vinilnitrila (**Figura 39**). Portanto, a ausência das bandas características de aldeído (C=O e OC-H) nos espectros dos produtos confirma o consumo do reagente.

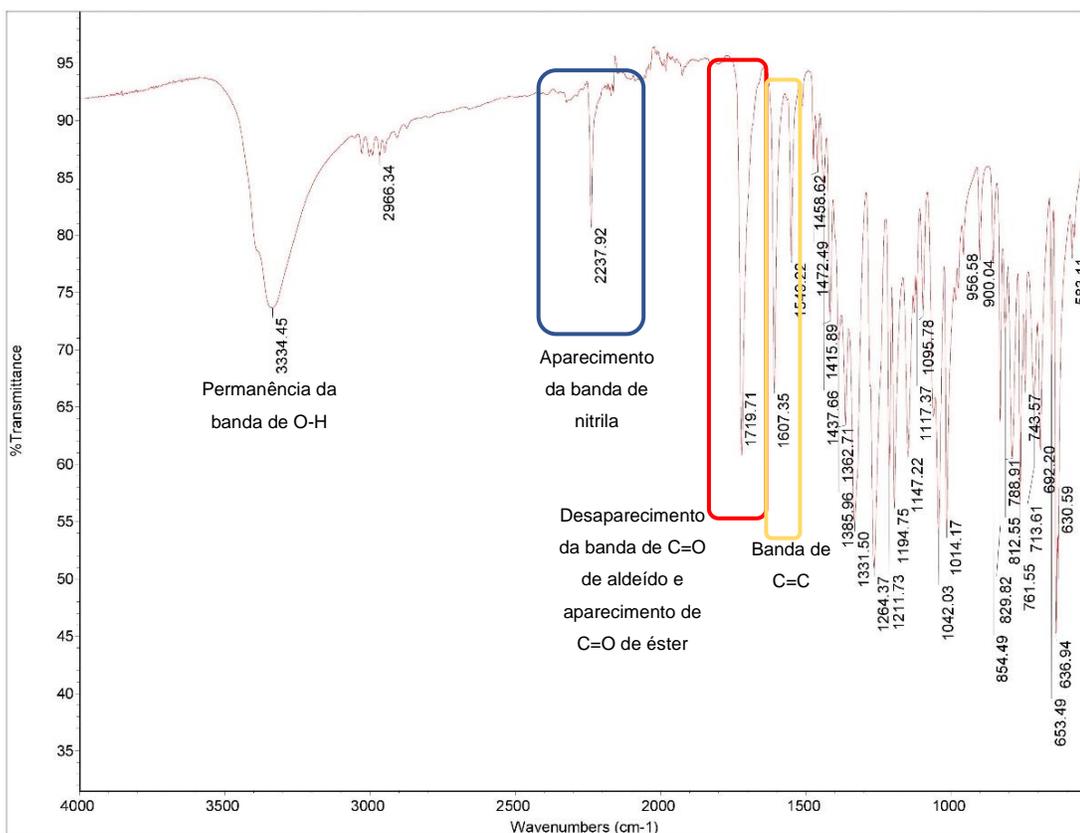


Figura 38 - Espectro de IV do composto **65c** e comparação com a **figura 36**

Além dessas informações, a análise por espectro de IV nos permite inferir se houve perda da unidade $B(OH)_2$ ou não. Ácidos arilborônicos apresentam 2 bandas características: a banda de deformação axial de hidroxilas (em alguns casos, essa banda pode se dividir em duas ν_{ass} e ν_s da ligação O-H) e a banda de deformação axial de B-O. A primeira banda é tipicamente larga e ocorre na faixa de $3500-3200\text{ cm}^{-1}$.²⁶⁰ A largura e o número de onda da banda dão indícios da presença de ligações de hidrogênio intermoleculares nestas moléculas. A presença destas ligações promove, da mesma forma que acontece com ácidos carboxílicos, um alargamento das bandas (maior número de transições possíveis) e uma diminuição no número de onda (hidroxila livre: $3700-3584\text{ cm}^{-1}$; hidroxila com ligação de hidrogênio: $3500-3200\text{ cm}^{-1}$).²⁶⁰ Entretanto, dependendo da forma de isolamento do produto, é possível obter o anidrido do ácido (boroxina). Neste caso, não há a banda de hidroxila entre 3500 e 3200 cm^{-1} no espectro. A presença do anidrido é constatada pela presença da banda forte em $680-705\text{ cm}^{-1}$.^{200c} A banda

referente ao estiramento assimétrico (ν_{ass}) da ligação B-O, é, normalmente, a banda mais intensa do espectro e ocorre entre 1380-1310 cm^{-1} .²⁶²

Bandas de estiramento de ligações duplas são, comumente, bastante intensas. Dessa forma, é possível que a alta intensidade do ν_{ass} B-O esteja correlacionada com a presença de um caráter de ligação dupla.^{262b} Já a banda de estiramento simétrico da ligação B-O é mais difícil de ser determinada, por ser menos intensa e ser uma combinação de vibrações de diferentes ligações. Essas duas bandas relatadas foram identificadas nos espectros de IV dos produtos, como pode ser visto no espectro de IV representativo (**Figura 38**). O espectro de IV do ácido 4-formilfenilborônico **63a**, que é o aldeído de partida dos compostos **65a** e **65c**, apresenta duas bandas referentes ao estiramento simétrico ($\nu_{\text{O-H}_s} = 3370 \text{ cm}^{-1}$) e assimétrico ($\nu_{\text{O-H}_{\text{ass}}} = 3201 \text{ cm}^{-1}$) da ligação O-H da unidade B(OH)_2 . Os seus derivados **65a** e **65c** apresentam o mesmo padrão com duas bandas de O-H. Entretanto, a ligação desses produtos encontra-se fortalecida (maior número de onda), em comparação com o aldeído de partida **63a**. Os valores de número de onda do composto **65a** são, $\nu_{\text{O-H}_s} = 3433 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{O-H}_{\text{ass}}} = 3341 \text{ cm}^{-1}$ e para o composto **65c** são, $\nu_{\text{O-H}_s} = 3390 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu_{\text{O-H}_{\text{ass}}} = 3334 \text{ cm}^{-1}$. Este fortalecimento deve-se ao caráter retirador de elétrons das vinilnitrilas. Já o ácido 3-formilfenilborônico **63b** apresenta apenas uma banda de O-H, no valor de 3291 cm^{-1} . Todavia, seu derivado **65b** apresenta duas bandas de estiramento, uma mais fortalecida, referente a vibração simétrica ($\nu_{\text{O-H}_s} = 3433 \text{ cm}^{-1}$) e outra com a mesma força ($\nu_{\text{O-H}_{\text{ass}}} = 3292 \text{ cm}^{-1}$). O derivado **65d**, por outro lado, apresenta apenas uma banda de O-H, da mesma forma que o seu aldeído de partida **63b**, contudo, sua ligação apresenta um maior número de onda, indicando um fortalecimento desta ligação.

As borono-tirfostinas também foram caracterizadas por ^1H -RMN. No espectro do aldeído 4-formilfenilborônico **63a** (**Figura 39 A**), é possível observar a presença de um simpleto em 10,15 ppm (O=C-H) e dois dupletos (8,11-7,96 ppm, C_{Ar} -H) característicos da substituição *para* (**63a**). No caso do ácido 3-formilfenilborônico (**63b**), além do simpleto do hidrogênio aldeídico (10,15 ppm), observa-se o padrão *meta* de substituição com um simpleto (8,44 ppm), 2 dupletos (8,23-8,04 ppm) e um tripleto (7,72-7,67 ppm), cada um integrando 1 H. Além dos sinais dos hidrogênios do anel *meta* substituído, observa-se um sinal integrando 2 H, provavelmente, esse sinal é referente aos hidrogênios da

hidroxila do grupamento $B(OH)_2$. Supreendentemente, os hidrogênios da hidroxila só são observados no espectro do ácido 3-formilfenilborônico **63b**. Possivelmente, a ausência do sinal correspondente aos dois hidrogênios da unidade $B(OH)_2$ no ácido 4-formilfenilborônico **63a** seja consequência da maior quantidade de água no solvente de RMN utilizado, pois hidrogênios ácidos podem ser trocados com a água, não aparecendo no espectro. O hidrogênio aldeídico é, normalmente, bastante desblindado (sinal entre 9 e 10 ppm). Portanto, a ausência de sinais nessa região mais desblindada do espectro, indica o consumo do aldeído.

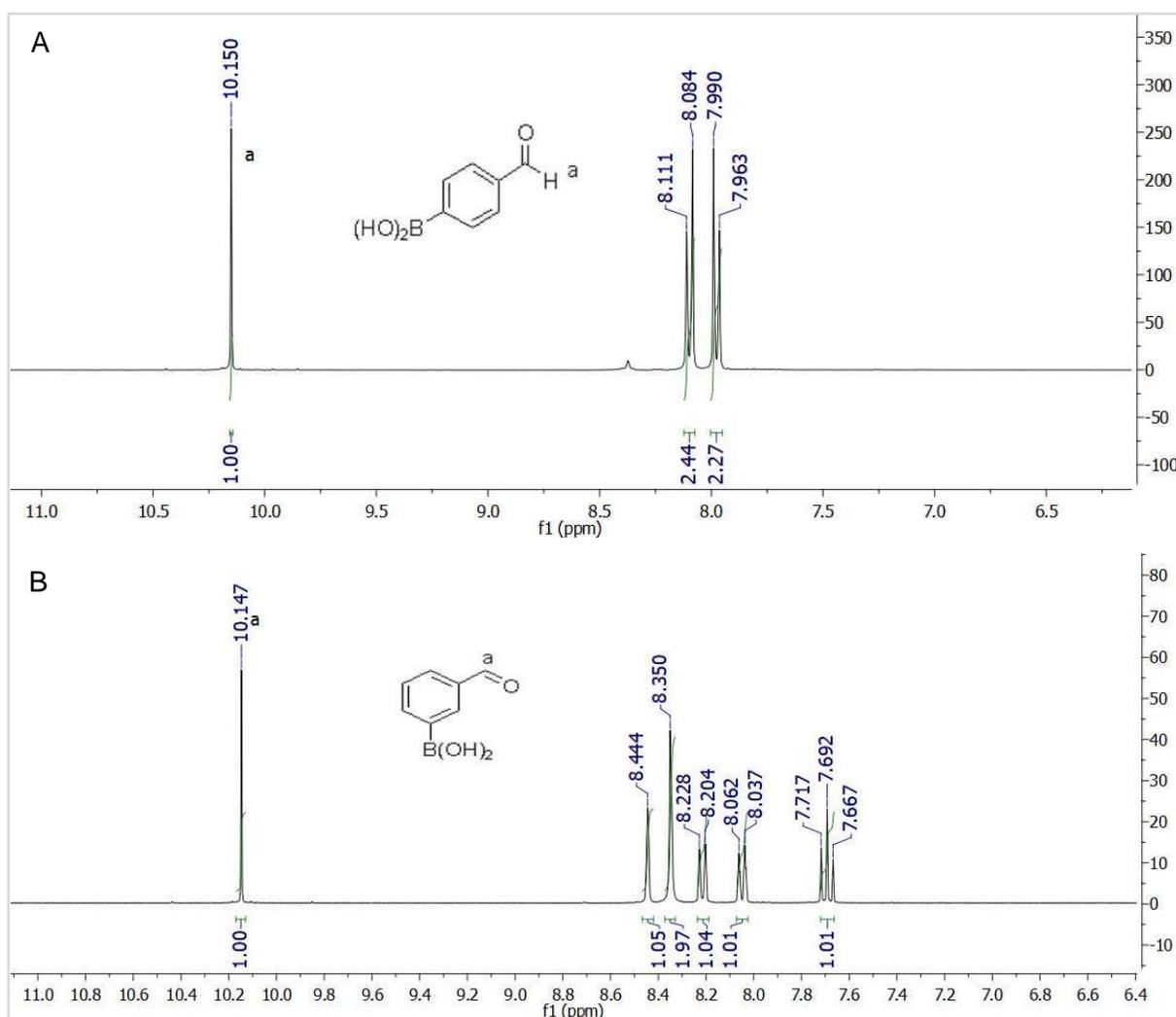
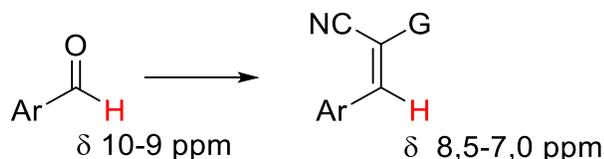


Figura 39 - Espectros de 1H -RMN dos aldeídos de partida em DMSO, 500 MHz: A) ácido 4-formilfenilborônico (**63a**) B) ácido 3-formilfenilborônico (**63b**)

A formação do produto desejado pode ser evidenciada pelo aparecimento de um novo pico referente ao hidrogênio vinílico o qual apresenta deslocamento químico entre 8,347-8,383 ppm para os produtos com o B(OH)₂ na posição *meta* e entre 8,484-8,505 para os produtos na posição *para* (**Figura 40**). Esses hidrogênios estão mais blindados do que o H aldeídico dos respectivos aldeídos de partida (**Esquema 18**).



Esquema 18 - Transformação do ambiente químico do hidrogênio

Na análise dos deslocamentos químicos do hidrogênio vinílico por RMN, observa-se que o hidrogênio vinílico do composto **65b** (G₁ = CN; G = 3-B(OH)₂) é o mais desblindado já que ele apresenta o maior deslocamento (8,505 ppm). Essa informação indica que esse hidrogênio está em um ambiente químico mais pobre em elétrons do que os das demais borono-tirfostinas. Já o hidrogênio vinílico de composto **65d** (G₁ = CO₂Et; G = 3-B(OH)₂), encontra-se no ambiente mais rico em elétrons da série, com o deslocamento de 8,347 ppm. Portanto, para as moléculas **65a** e **65b**, a posição *meta* desblinda mais o H vinílico e para as moléculas **65c** e **65d** é a posição *para* que desblinda mais o H vinílico. Além disso, observa-se que os picos dos hidrogênios dos produtos com malononitrila **65a** e **65b** são mais blindados do que os hidrogênios aromáticos dos produtos com o cianoacetato de etila **65c** e **65d** (**Figura 40**). Os derivados de cianoacetato de etila, além de apresentarem os picos na região de aromáticos, apresentam dois picos (um tripleto e um quarteto) na região de alifáticos. Adicionalmente, os produtos com o cianoacetato de etila apresentam dois conjuntos de sinais (quarteto entre 4,50-4,31 ppm e tripleto entre 1,50- 1,30 ppm) referentes à etila do éster.

Em todos os espectros de ¹H-RMN dos produtos é possível observar um pico sobressalente. Após a realização de experimentos de troca de deutério, constatou-se que estes picos são referentes aos hidrogênios das hidroxilas da unidade B(OH)₂ (**Figura 41**). O padrão de picos encontrados nos espectros dos produtos **65c** e **65d** mostram, que apesar de ser possível obter dois diastereoisômeros (*E* e *Z*), apenas um é obtido. De

acordo com dados da literatura, espera-se o favorecimento diastereoisômero *E*. Observou-se que os grupamentos mais volumosos da vinilnitrila ficam *trans* em relação à fenila.²⁶³ Rodrigues, em sua dissertação de mestrado realizou um estudo da preferência diastereoisomérica da reação de Knoevenagel com o cianoacetato de etila. Após diferentes avaliações teóricas e experimentais, constatou que a preferência pelo isômero *E*, no caso do cianoacetato de etila, é independente do caráter doador ou retirador de elétrons do substituinte do anel aromático. A predileção ao diastereoisômero *E* foi atribuído ao equilíbrio de isomerização e não ao mecanismo da reação.²⁶³

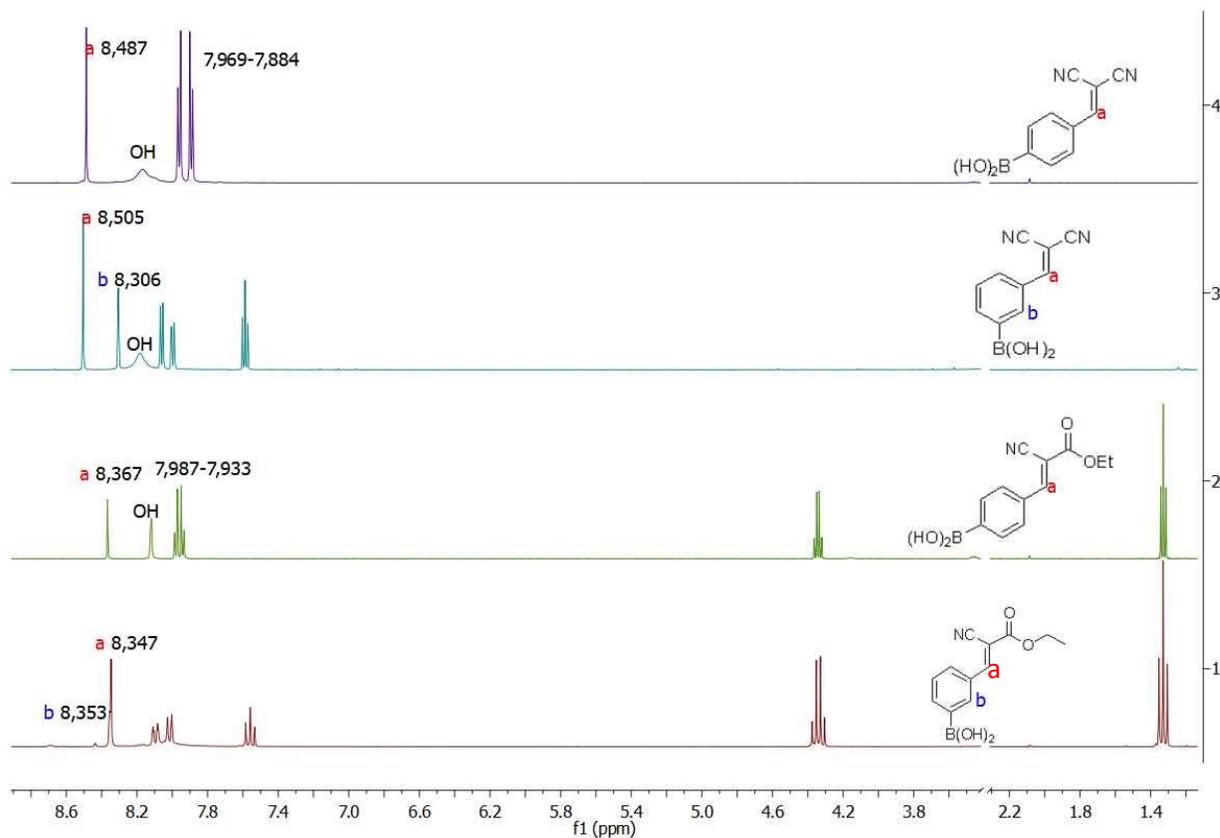


Figura 40 - Espectro de ¹H-RMN e comparação das borono-tirfostinas obtidas

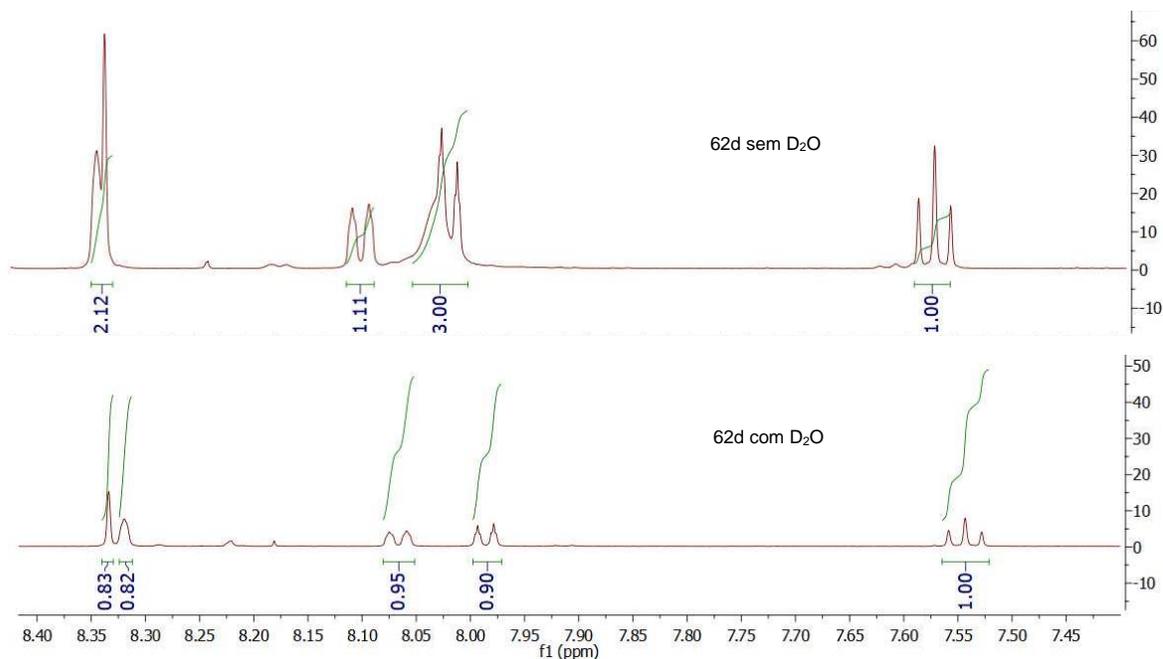
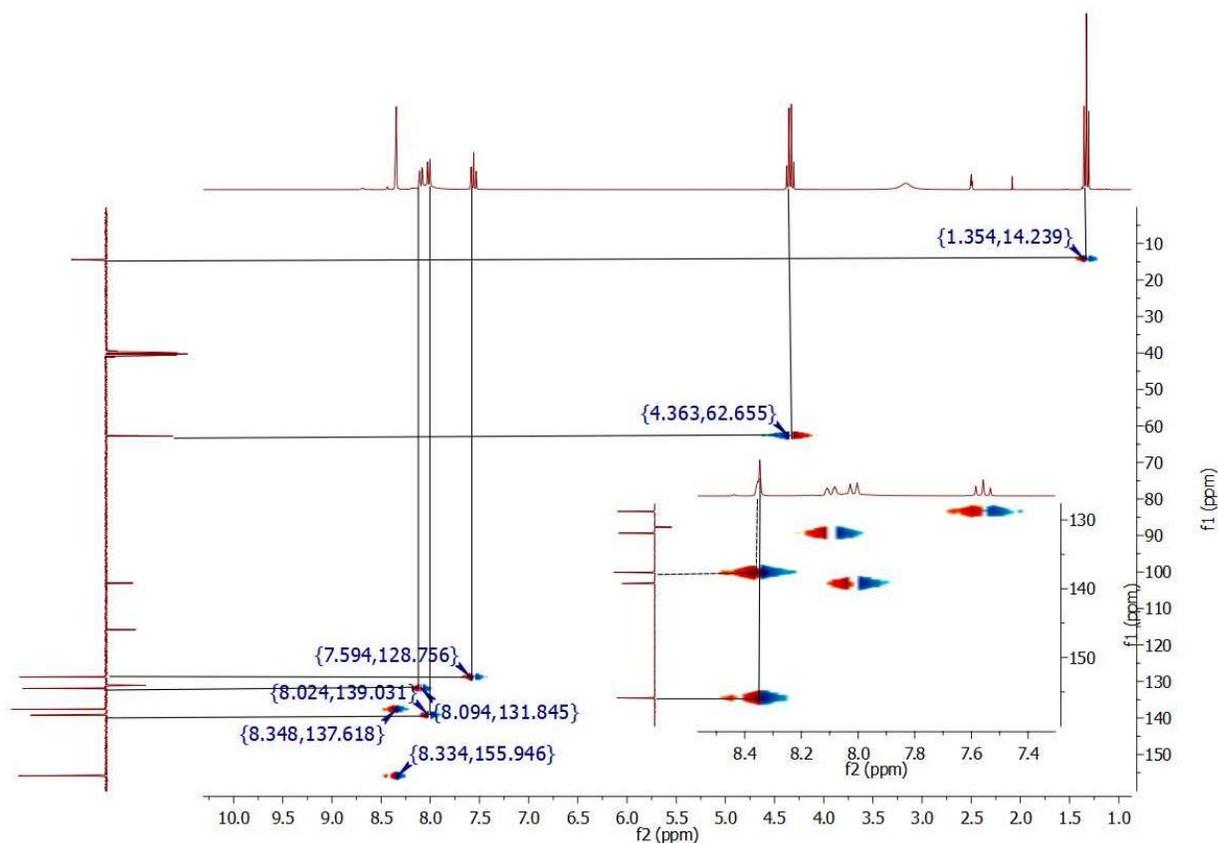


Figura 41 - Experimento de troca de deutério do composto **65d**

Foi realizada a análise de ^{13}C -RMN para caracterização dos produtos. Por questões de simetria, esperava-se a presença de 8 picos de carbono para o **65a**, 10 para o composto **65b**, 10 para o **65c** e 12 para o composto **65d**. Entretanto, observou-se um pico a menos em todos os espectros. Inicialmente, a ausência destes picos causou certa estranheza, uma vez que, não havia explicações de simetria para o ocorrido. Após busca na literatura, constatou-se que, na maioria dos casos, o carbono ligado diretamente ao boro (carbono *ipso*) não aparece no espectro de ^{13}C -RMN, ou aparece como um pico pequeno e largo.²⁶³ Esse fenômeno ocorre devido às propriedades magnéticas únicas do boro: tempo de relaxamento curto e momento de quadrupolo do ^{11}B ($I = 3/2$) que acopla com o carbono, gerando um pico pouco resolvido, principalmente por estar ligado um carbono quaternário.²⁶⁴ Essa particularidade de compostos organoborados, presente nos espectros dos produtos sintetizados, é mais uma informação que sugere a presença do boro na molécula.

Além dessa análise, realizou-se também a análise de HSQC. O espectro de HSQC, dependendo da estrutura (se os carbonos forem suficientemente diferentes), permite a confirmação do assinalamento dos H aos seus respectivos carbonos. O HSQC é uma ferramenta importante quando há dúvida na atribuição dos hidrogênios ou dos carbonos.

Por exemplo, no caso dos produtos *meta* substituídos, havia dúvida na atribuição de dois simpletos. O simpleto do hidrogênio vinílico e o simpleto do padrão de substituição *meta* do anel. Ambos se encontravam na região mais desblindada do espectro (com deslocamentos próximos). A única diferença observada no espectro de hidrogênio era a largura dos picos, o que nos dava apenas indícios da atribuição correta. Entretanto, o carbono aos quais esses hidrogênios estavam atrelados, possuíam diferenças de deslocamento químico significativas (carbono de anel aromático e carbono vinílico). Portanto, o espectro de HSQC, que demonstra a correlação entre o carbono e seu hidrogênio adjacente, sana essa dúvida (**Figura 42**). O espectro de HSQC do composto **65d** correlaciona o pico do carbono mais desblindado, próximo de 160 ppm, ao simpleto mais blindado do espectro, permitindo a atribuição do deslocamento químico do hidrogênio vinílico.



Apesar da análise de RMN de ^{11}B não ter sido feita, têm-se dados suficientes para afirmar a permanência da unidade $\text{B}(\text{OH})_2$ na estrutura sintetizada. Os dados de IV com suas bandas características, o comportamento térmico das moléculas, a ausência de um pico de carbono no ^{13}C -RMN, e, além disso, a análise de Raio-X.

Os ácidos borônicos inéditos foram cristalizados para que suas propriedades no estado sólido fossem estudadas. Obtiveram-se informações sobre as interações intermoleculares, ângulos e comprimentos de ligação, confirmou-se a presença da unidade $\text{B}(\text{OH})_2$ e determinou-se qual foi o diastereoisômero obtido.

As moléculas foram cristalizadas em diferentes sistemas de solventes, com o objetivo de obter cristais com tamanho favorável para serem medidos através da técnica de difração de Raios-X.

O cristal do **65b** foi obtido empregando-se de uma mistura entre THF e pentano. O processo utilizado para cristalizar é melhor compreendido observando a **figura 43**. Solubilizou-se o produto em THF e o frasco contendo a solução foi colocado dentro de outro frasco contendo pentano. Este sistema foi vedado e colocado no freezer até cristalizar. O fenômeno envolvido nesta cristalização consiste na diminuição da polaridade da solução. A atmosfera dentro do frasco é saturada pelo líquido de ponto de ebulição mais baixo, neste caso, o pentano. Com o aumento da pressão interna, o pentano é forçado a condensar na superfície do THF, desta forma, a solução contendo o produto torna-se mais apolar. Com esta mudança de polaridade do solvente, as moléculas do soluto, o composto **65b**, reorganizam-se aumentando as interações intermoleculares, o que favorece a formação de monocristais. A temperatura baixa também favorece a formação de cristais, uma vez que, diminui a entropia do meio.²⁶⁵

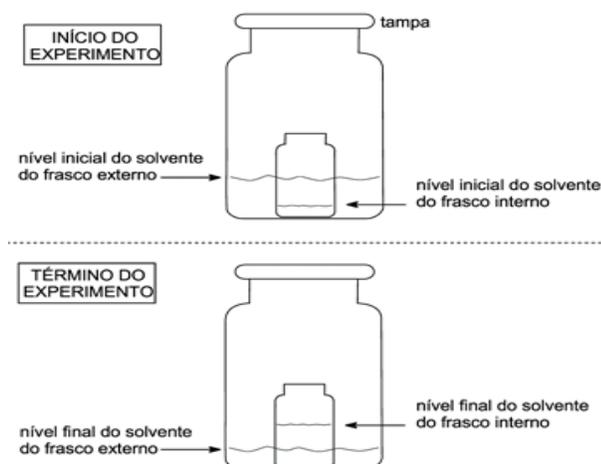


Figura 43 - Cristalização do 65b²⁶⁵

Os cristais dos produtos **65a**, **65c** e **65d** foram obtidos pela mesma técnica. A única diferença foi o solvente utilizado: os produtos **65a** e **65c** foram obtidos em uma mistura água/etanol, já o composto **65d**, foi obtido em água/acetona.

Os produtos foram colocados em frascos com água destilada e então, adicionou-se etanol ou acetona gota a gota até a completa solubilização. Utilizou-se o ultrassom com aquecimento para facilitar a solubilização. À medida que o solvente volátil evapora à temperatura ambiente, as moléculas dos ácidos borônicos, presentes na solução, interagem com maior energia, uma vez que, estes compostos são insolúveis em água, desta forma, o monocrystal é formado pelo aumento da insolubilidade no sistema supersaturado.

Os dados cristalográficos e a representação ORTEP (elipsóides em 50% de probabilidade)²⁶⁶ das estruturas se encontram-se na **tabela 13** e nas **figuras 44, 45, 46 e 47**.

Tabela 13 - Dados cristalográficos

	65a	65b	65c	65d
Fórmula Empírica	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂ B	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₂ B. H ₂ O	C ₁₂ H ₁₂ NO ₄ B	C ₁₂ H ₁₂ NO ₄ B
Massa Molecular (g/mol)	197,99	216,00	245,04	245,04
Sistema Cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo Espacial	C ₂ /c	P-1	P2 ₁ /n	P2 ₁ /n
Dimensões da Célula Unitária	a = 11,1500 (8) Å α = 90,00°	a = 3,752 (3) Å α = 104,08 (2)°	a = 7,573 (12) Å α = 97,63 (3)°	a = 4,055 (5) Å α = 90,00°
	b = 10,0434 (9) Å β = 92,084 (3)°	b = 10,113 (7) Å β = 96,26 (2)°	b = 7,713 (9) Å β = 93,48 (4)°	b = 15,168 (2) Å β = 90,00°
	c = 17,1086 (15) Å γ = 90,00°	c = 14,374 (9) Å γ = 94,47 (2)°	c = 11,332 (18) Å γ = 112,06 (6)°	c = 19,581 (2) Å γ = 90,00°
Volume (Å)³	1914,6 (3)	522,8 (6)	603,62 (15)	1204,4 (3)
Z	8	2	2	4
Densidade (g/cm³)	1,374	1,372	1,348	1,351
Dimensão dos cristais (mm³)	0,746 × 0,294 × 0,07	0,215 × 0,069 × 0,065	0,547 × 0,230 × 0,186	0,275 × 0,075 × 0,060
Reflexões coletadas\ Refl. independentes	11056/ 1746 [Rint = 0,0790; Rsigma = 0,0526]	9500/1903 [Rint = 0,1204; Rsigma = 0,0884]	5898/2099 [Rint = 0,0443; Rsigma = 0,0515]	7527/2120 [Rint = 0,0374; Rsigma = 0,0330]
Nº de refl. úni./par. refinados	1746/142	1903/150	2099/165	2120/170
R₁/wR2[I >=2σ(I)]	0,0639/0,1694	0,1304/0,3723	0,0528/0,1271	0,1013/ 0,2716
Goof	1,081	1,227	1,057	1,181

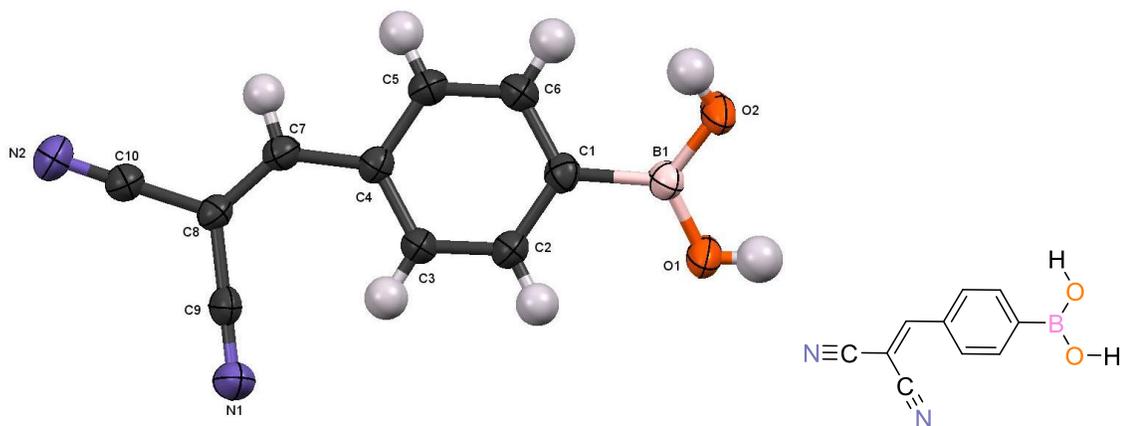


Figura 44 - Composto **65a** (NO-01)

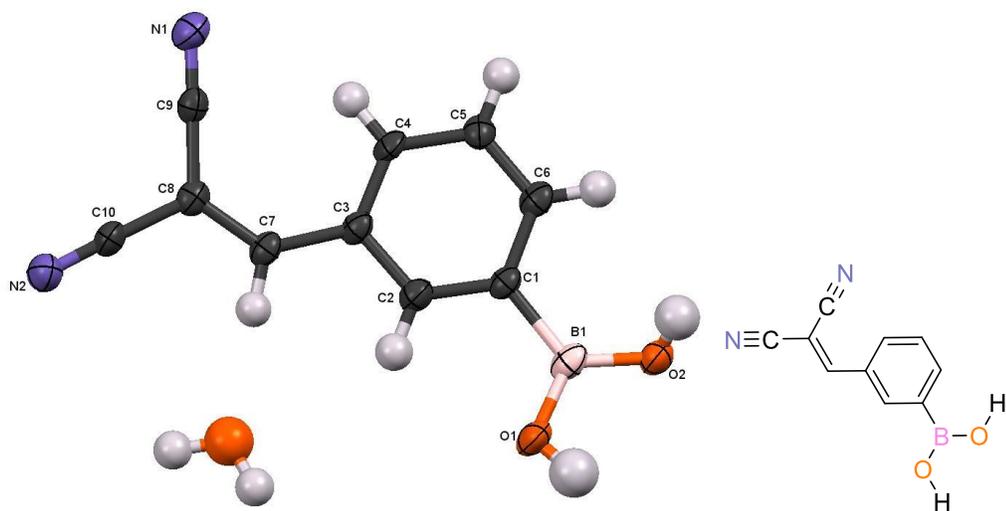


Figura 45 - Composto **65b** (NO-03)

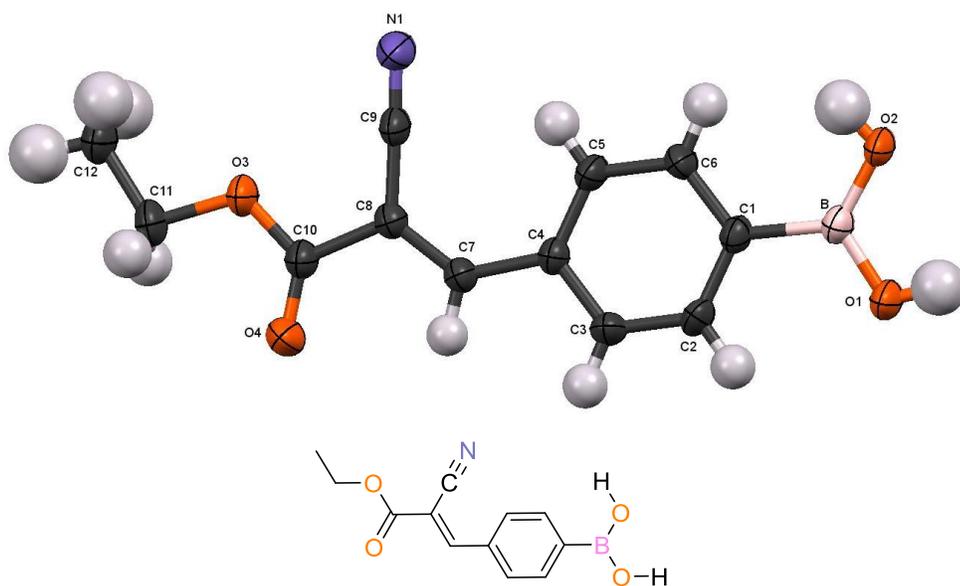


Figura 46 - Composto 65c (NO-12)

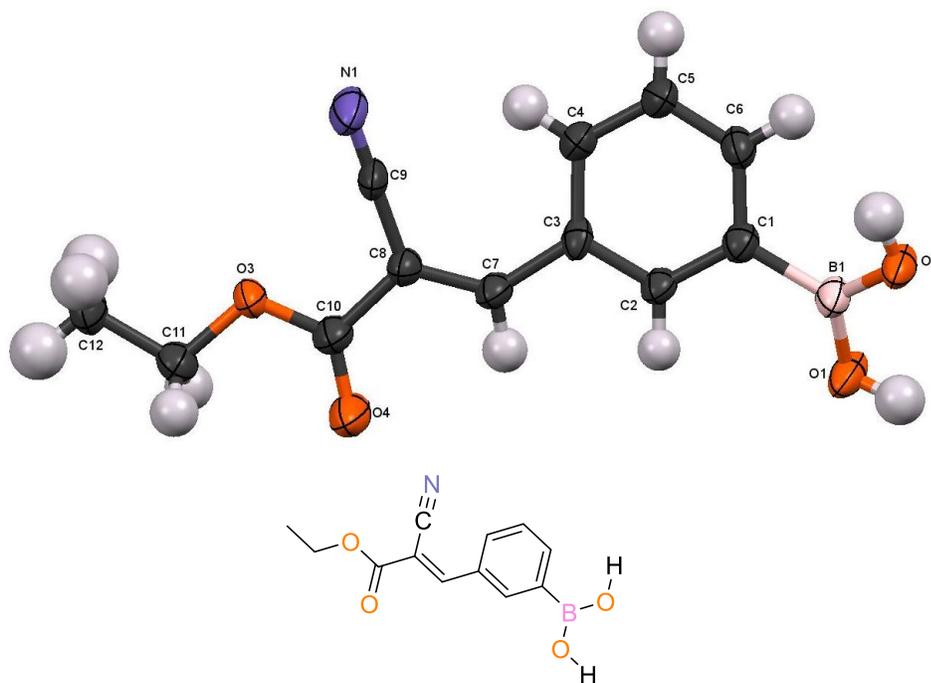


Figura 47 - Composto 65d (NO-13)

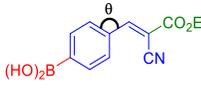
Os resultados apresentados na **tabela 13** nos permitem inferir que as estruturas cristalinas dos compostos puderam ser descritas adequadamente. Os cristais dos compostos *m*-substituídos **65b** e **65d** apresentaram parâmetros estatísticos de

refinamento com pior qualidade. $GooF = 1,227$ e $1,181$ e $R_1 = 0,13$ e $0,10$, respectivamente (valores ideais: $GooF = 1$ e $R_1 = 0,02-0,06$).²⁶⁷ Possivelmente, este fato está relacionado às interações intermoleculares mais fracas nestes compostos, impossibilitando a formação de cristais com poucos defeitos estruturais, ou com o tamanho dos cristais obtidos. Outro fator relevante no cristal de **65b** foi a presença da molécula de água de cristalização (maior massa molecular, $MM = 216,0$ g/mol). Esta molécula ocupa uma cavidade no empacotamento cristalino, porém foi descrita com uma desordem ocupacional com fracas interações intermoleculares. A representação ORTEP, gerada pelos dados cristalográficos obtidos, mostra que os compostos com cianoacetato de etila foram obtidos na configuração *E*.

Nenhuma anomalia com relação aos comprimentos de ligação é observada nesse grupo de moléculas, ou seja, não há nenhuma grande distorção. Os valores encontram-se dentro do esperado, segundo a literatura,²⁶⁸ para estes tipos de ligação. Os valores dos comprimentos de ligações dos produtos obtidos e da literatura, encontram-se no apêndice A.

A disposição da molécula no espaço dependerá dos seus substituintes ($C\equiv N$ ou CO_2Et). Estes grupos funcionais podem promover torções nas ligações devido a forças atrativas ou repulsivas. O padrão de substituição (*para* ou *meta*) do anel aromático também influenciará diretamente nesta organização espacial. Analisando as **figuras 48, 49, 50 e 51** e a **tabela 14**, é possível comparar os efeitos destes substituintes na molécula.

Tabela 14 - Ângulos de torção

Ângulo	65a 	65b 	65c 	65d 
$C_xC_yC_7C_8$	0,2 (4)°	-8,0 (14)°	174,8 (2)°	-19,3 (11)°
$C_2C_1BO_1$	23,0 (3)°	-8,4 (12)°	8,4 (3)°	31,5 (10)°

- No 65a e no 65c $x = 3$ e $y = 4$, no 65b e no 65d $x = 4$ e $y = 3$.

Observa-se que a torção entre o anel e o grupamento vinilnitrila é menor nos produtos *para* substituídos (**65a** e **65c**) do que nos *meta* substituídos (**65b** e **65d**). O desvio da planaridade com respeito ao anel aromático foi analisado durante o refinamento e observa-se que as moléculas *meta* substituídas saem mais do plano. Por outro lado, as *para* substituídas aproximam-se da planaridade, quanto mais distante do plano formado pelo anel aromático, maior é o desvio. De fato, no composto **65a** *p*-substituído os átomos de nitrogênio das nitrilas estão situados a 0,036(5) Å, para N1, e da 0,097(6) Å para N2 do plano formado pelo grupamento fenila. No composto **65b**, os átomos de nitrogênio das nitrilas estão situados a 0,670(19) Å para N1 e da 0,308(23) Å para N2 do plano formado pelo grupamento fenila. Para o composto **65a**, os maiores desvios de planaridade são observados para os átomos de oxigênio do grupamento borono localizados a - 0,5334(4) Å para O1 e 0,418(4) Å, para O2 do plano do anel aromático. Dentre os produtos com o cianoacetato de etila aquele que apresenta maior desvio é o **65d**, também *m*-substituído. Neste, os átomos que mais se distanciam do plano formado pelo grupamento fenila são o nitrogênio e o carbono da nitrila descritos a: - 1,23 (14) Å e a - 0,845(13) Å. O produto **65c** também apresenta desvios na nitrila com relação ao plano do anel aromático. Entretanto, estes valores são menos pronunciados do que no **65d** localizando-se a 0,418(5) Å. Muito provavelmente, o que determinará a torção e os desvios de planaridade serão as ligações de hidrogênio realizadas com outras moléculas do cristal.

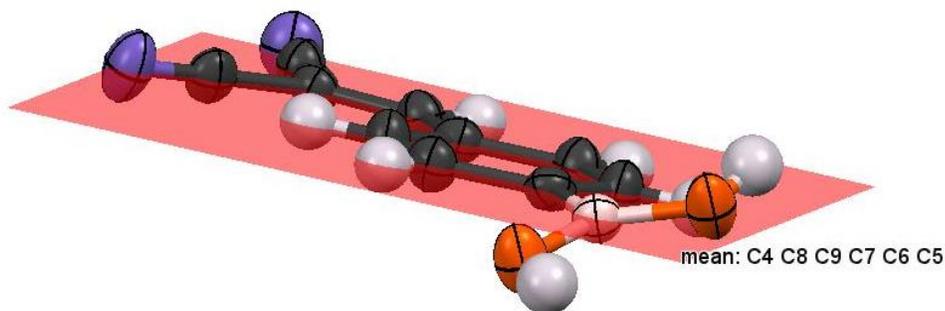


Figura 48 - Molécula **65a** no plano formado pelo anel aromático

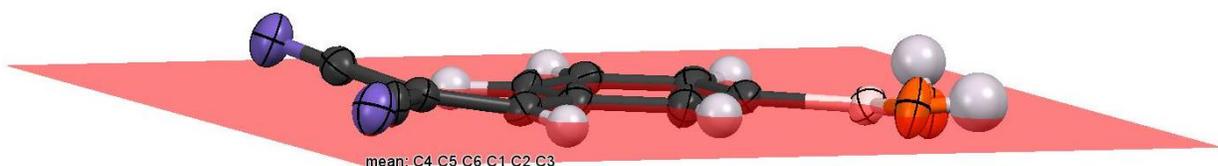


Figura 49 - Molécula **65b** no plano formado pelo anel aromático

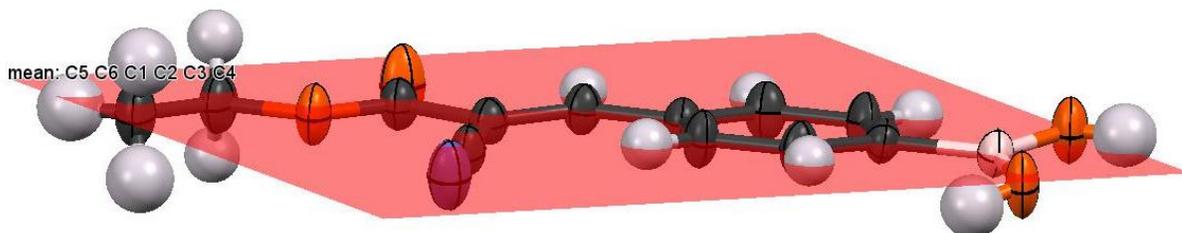


Figura 50 - Molécula **65c** no plano formado pelo anel aromático

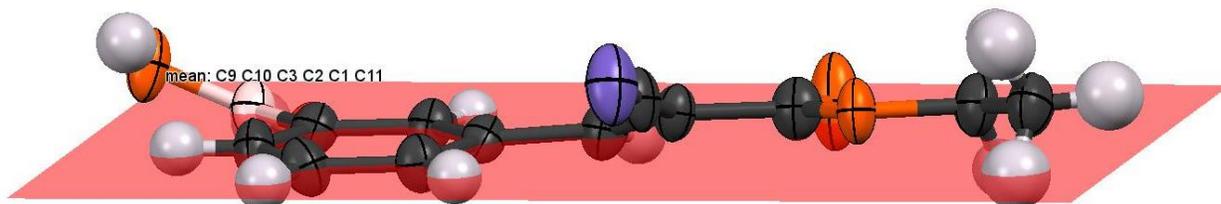
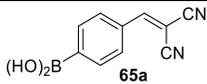
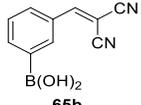
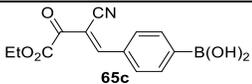
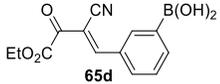


Figura 51 - Molécula **65d** no plano formado pelo anel aromático

As interações intermoleculares são responsáveis pela auto-organização das moléculas no estado sólido, portanto, as suas características devem ser avaliadas para que seja possível uma melhor compreensão do empacotamento cristalino de cada produto. As características das interações intermoleculares estão expostas na **tabela 15**.

Tabela 15 - Ligações de Hidrogênio

D—H...R	D—H (Å)	H...R (Å)	D...R (Å)	D—H...R (°)
 65a				
O1—H1...O2 ⁱ	0,84	1,99	2,814 (2)	167
O2—H2...N1 ⁱⁱ	0,84	2,05	2,878 (3)	170
Código de Simetria: (i) -x-1, 2-y, 3-z; (ii) -1-x, 1-y, 2-z				
 65b				
O1—H1...O2 ⁱ	0,84	1,94	2,755(8)	164
O2—H2...N2 ⁱⁱ	0,84	2,39	2,794(10)	110
O1W1-H1WA...O1 ⁱⁱⁱ	0,87	2,105	2,891(4)	150
Código de Simetria: (i) -x, -y+2, -z+1; (ii) x-1, y+1, z; (iii) -x+1, -y+1, -z+1				
 65c				
O1—H1...O2 ⁱ	0,84	2,00	2,815 (2)	174
O2—H2...N1 ⁱⁱ	0,84	2,06	2,831 (3)	156
Código de Simetria: (i) -x-1, 2-y, 3-z; (ii) -1-x, 1-y, 2-z				
 65d				
O1—H1...O2 ⁱ	0,84	1,95	2,809 (6)	162
O2—H2...N1 ⁱⁱ	0,84	2,14	3,019 (7)	164
C11—H11A...O1 ⁱⁱⁱ	0,97	2,64	3,249 (8)	120
Código de Simetria: (i) 1-x, 1-y, 2-z; (ii) 1-x, -y, 2-z; (iii) 1/2-x, -1/2+y, 3/2-z				

As estruturas cristalinas dos compostos obtidos e a formação dos dímeros de ácidos borônicos são estabilizadas por ligações de hidrogênio do grupamento nitrila com o ácido borônico. Essas são as principais interações intermoleculares observadas nos empacotamentos cristalinos. Os ângulos das ligações de hidrogênio são importantes na determinação da força destas, quanto mais próximos de 180° (mais frontal), mais efetiva é a ligação. Além do ângulo, outro fator que influencia a força desta interação é o

comprimento da ligação. Em geral, as ligações de hidrogênio apresentam energias semelhantes, isto é, observa-se que as distâncias doador-receptor (**D...R**) dessas interações apresentam valores parecidos. O produto **65d** foi o único que apresentou um valor destoante de 3,02 Å (maior comprimento de ligação) na interação O2—H2...N1, este resultado pode ser consequência do impedimento espacial causado pelo acetato de etila associado ao efeito da substituição na posição *meta* que dificulta a aproximação das moléculas. Os contatos dessas interações podem ser visualizados por meio das superfícies de Hirshfeld, apresentadas nas **figuras 52, 53, 54 e 55**. Estas superfícies têm como propósito definir o espaço ocupado pelas moléculas em um cristal, segmentando as suas densidades eletrônicas em fragmentos moleculares. Atualmente, diferentes tipos de superfícies são utilizadas na química cristalográfica. Por exemplo: CPK (CPK = Iniciais dos idealizadores, Robert Corey, Linus Pauling e Walter Koltun) e a superfície Connolly. A superfície de Hirshfeld define o volume ao redor da molécula de forma similar à superfície de van der Waals. Entretanto, o diferencial dessa superfície é que ela leva em consideração não só a molécula, como no caso da superfície de van der Waals, mas também a sua vizinhança. Dessa forma, este tipo de superfície apresenta informações sobre as interações intermoleculares.²⁶⁹

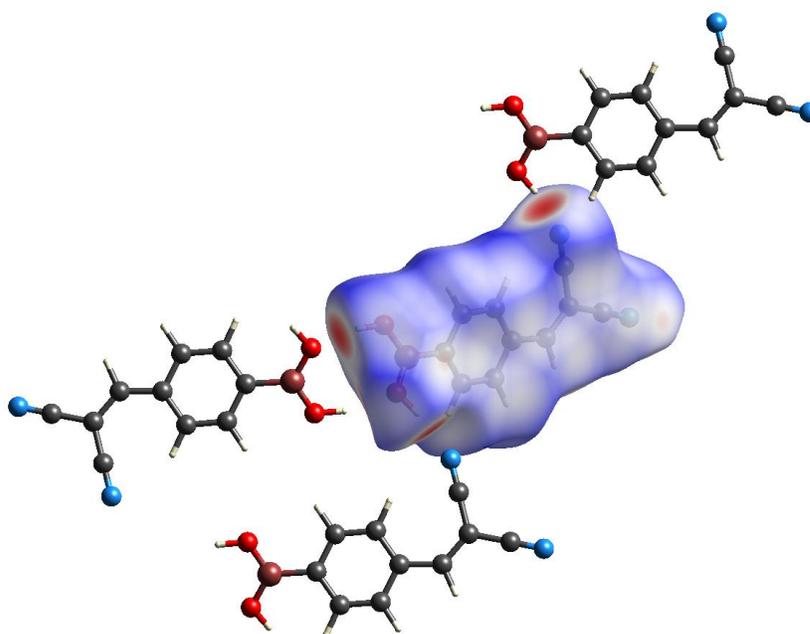


Figura 52 - Superfície de Hirshfeld para o **65a**

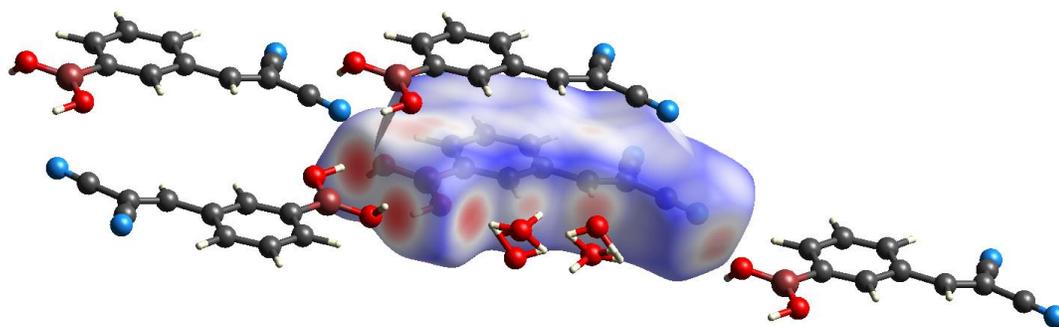


Figura 53 - Superfície de Hirshfeld para o **65b**

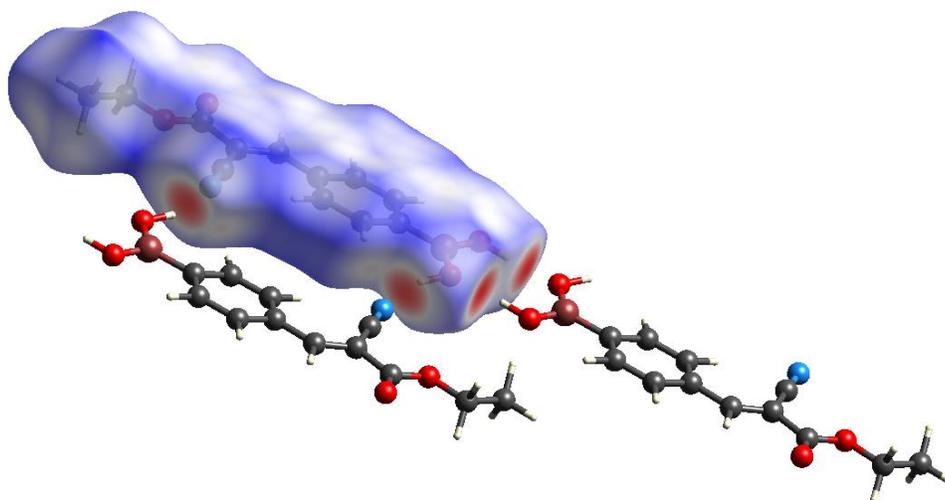


Figura 54 - Superfície de Hirshfeld para o **65c**

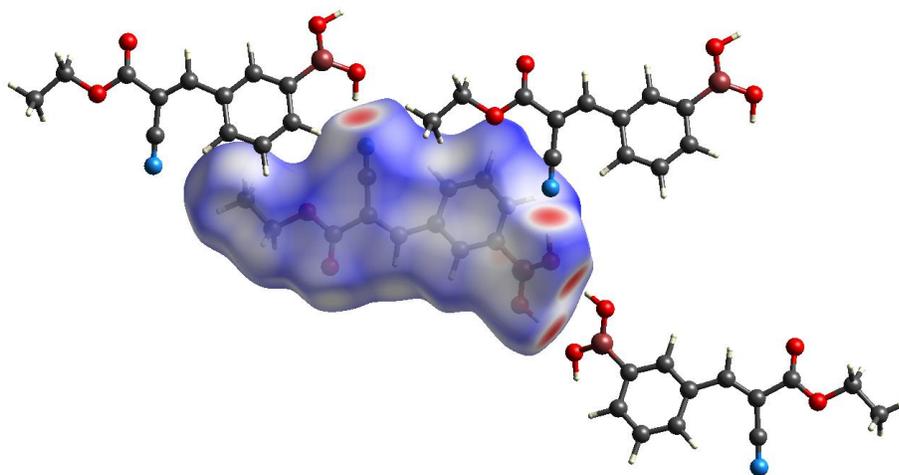


Figura 55 - Superfície de Hirshfeld para o **65d**

4.2. Estudos *in silico* direcionados para proteínas quinases

4.2.1. Quimiogenômica

Estudos de quimiogenômica foram realizados pelo grupo de pesquisa da Dr.^a Nelilma Romeiro, com o objetivo de obter mais informações sobre o potencial de interação das benzeno-vininitrilas com tirosinas quinases. Utilizou-se nesse estudo o protocolo do *Software* PIDGIN²⁷⁰ e o banco de dados ChEMBL,²⁷¹ disponível na literatura.

A técnica utilizada combina informações químicas e biológicas através de métodos computacionais para investigar bibliotecas moleculares, capazes de interagir com alvos moleculares de interesse. Portanto, a quimiogenômica é uma estratégia interdisciplinar que visa acelerar o processo de descobertas de fármacos. Esse método tem possibilitado o desenvolvimento racional de fármacos para o tratamento de diversas doenças, com destaque para o tratamento do câncer e de doenças inflamatórias, apesar das limitações envolvidas em um cálculo teórico. Através dos estudos de quimiogenômica, foram apontados alvos moleculares em potencial para a série de benzeno-vinilnitrilas preparadas, os quais alvos pertencem à família das proteínas quinases (**Figura 56**)

Um dos alvos sugeridos para as moléculas **64d (NO-07)**, **64e (NO-08)**, **65a (NO-01)** e **65b (NO-03)** foi DYRK1a (*dual specificity tyrosine(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1a*). Essa tirosina, pertencente à família DYRK, é conhecida por ser ativada através da autofosforilação de resíduos de tirosina, apesar de fosforilar resíduos de serina e treonina de seus substratos. Além disso, a DYRK1a é estudada por seu papel no desenvolvimento de câncer²⁷² e sua ação regulatória sobre a EGFR.²⁷³

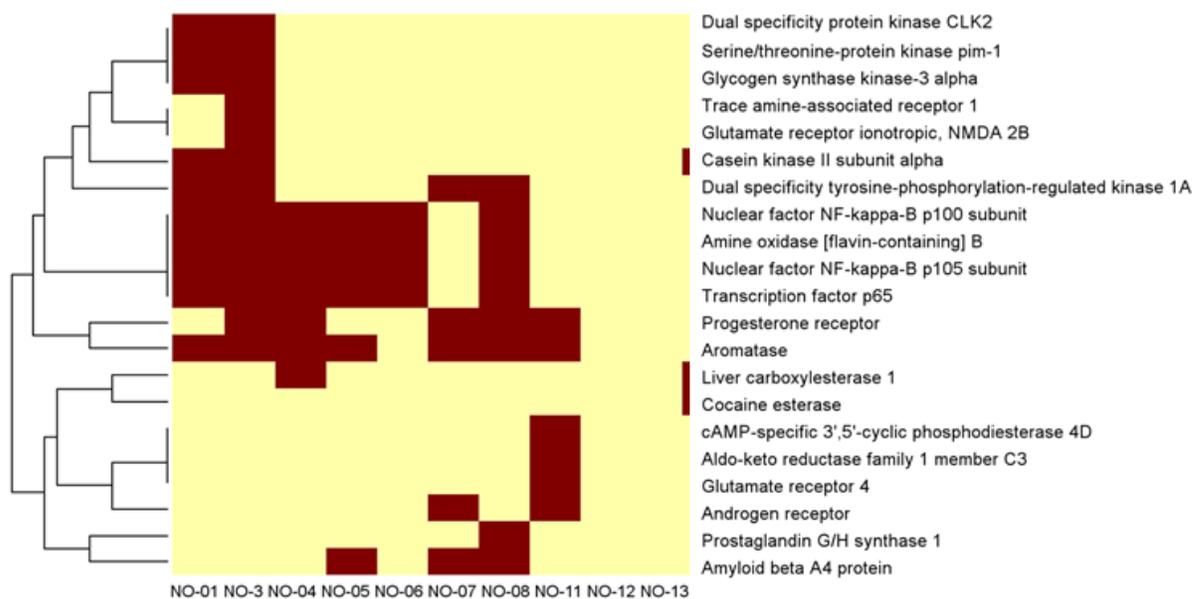


Figura 56 - Gráfico “heatmap”

4.2.2. Docking molecular

De modo a identificar os sítios de ligação potenciais em tirosinas quinases para os ligantes ativos (compostos sintetizados), foram realizados estudos de *docking* molecular utilizando a tirosina DYRK1a como modelo. A função ChemPLP foi escolhida para a realização dos estudos. Na **figura 57**, é possível observar a interação teórica do **NO-01 (65a)** com o sítio ativo da enzima escolhida. O estudo teórico prevê a interação do grupamento cianovinílico do **NO-01** com o resíduo de lisina LYS188 e com o grupo -NH do aspartato ASP307, através de ligação de hidrogênio. O **NO-01** também pode interagir por ligação de hidrogênio com o grupo -NH da leucina LEU242 e com a cadeia lateral da serina SER242, através da unidade B(OH)₂. Adicionalmente, foram previstas interações de van der Waals entre o anel aromático do **NO-01** e a VAL173, a LEU241, a LEU294 e a PHE238 no sítio ativo. No anexo A encontram-se os estudos de *docking* para as outras moléculas sintetizadas.

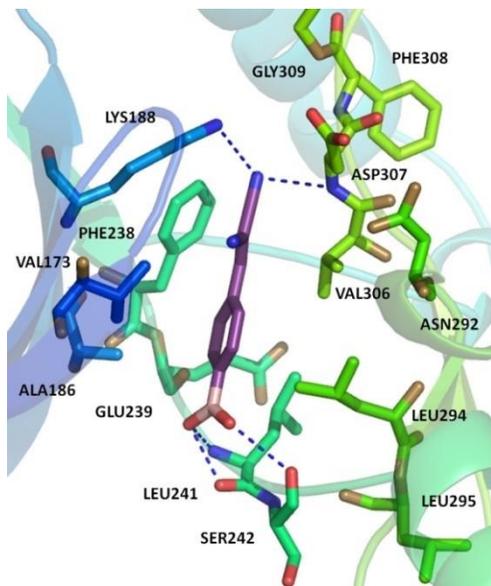


Figura 57 - Posição de interação entre a borono-tirfostina **65a (NO-01)** e a DYRK1a sugerida pelo estudo de *docking*. As ligações de hidrogênio estão representadas em linha pontilhada azul

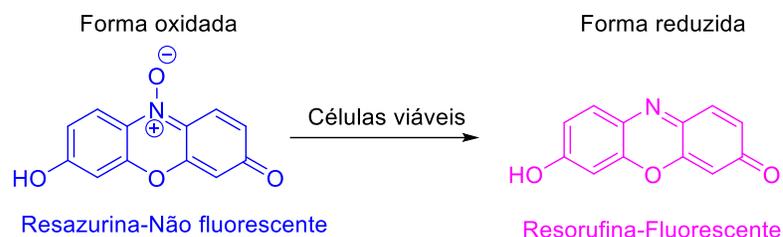
4.3. Testes biológicos

As benzeno-vinilnitrilas sintetizadas foram avaliadas quanto a sua atividade anticâncer, tripanocida, anti-inflamatória e inibitória do receptor P2X7 pelo grupo de pesquisa do Dr. Robson Xavier na FIOCRUZ. Tanto as benzeno-vinilnitrilas com o boro, quanto as sem boro foram avaliadas com o objetivo de investigar o efeito da introdução da unidade $B(OH)_2$ na atividade biológica das tirfostinas. Adicionalmente, a toxicidade dos compostos em células de mamíferos também foi examinada.

4.3.1. Análise de toxicidade em células primárias de mamífero

Inicialmente, avaliou-se a citotoxicidade das moléculas sintetizadas em células de mamíferos por ensaio colorimétrico. No teste, foi medida a capacidade das células de macrófagos peritoneais de camundongos de reduzir a resazurina (conhecida comercialmente como Alamar blue), na presença do composto analisado. Células viáveis, com metabolismo ativo, são capazes de reduzir a resazurina (azul e não-fluorescente)

em resorufina (rosa e fluorescente) (**Esquema 19**). Portanto, é possível estimar a citotoxicidade da substância e quantificar as células viáveis, uma vez que, o número de células viáveis após o teste é proporcional à resorufina produzida. Como controle positivo foi utilizado o detergente não-iônico Triton X-100 (Tx-100), que provoca o rompimento da membrana plasmática e, por isso, a redução de resazurina é mínima. No controle negativo, não há adição de nenhuma substância. Na **tabela 16**, é possível observar a citotoxicidade dos compostos e seus efeitos antiproliferativos em linhagens de células malignas.



Esquema 19 - Avaliação da viabilidade celular por redução de resazurina

Nenhuma das benzeno-vinilnitrilas sintetizadas apresentou toxicidade ($\geq 99,30\%$) na concentração de $100 \mu\text{M}$, quando testadas frente a macrófagos peritoneais primários selvagens por 72 h. O mesmo aconteceu para a linhagem macrofágica J774.G8 de camundongo, a qual foi insensível ao tratamento com os compostos. No caso da linhagem de células de rato GH3 (células originárias de tumor pituitário de rato), as células foram parcialmente afetadas por **64a (NO-04)** ($G_1 = \text{CN}$, $G = \text{H}$), apresentando um percentual de redução de resazurina de 50%. As benzeno-vinilnitrilas **64f (NO-11)** ($G_1 = \text{CN}$, $G = 3\text{-NO}_2$) e **65c (NO-12)** ($G_1 = \text{CO}_2\text{Et}$, $G = 4\text{-B(OH)}_2$) foram mais eficazes em reduzir a proliferação em 23,56% e 32,8%, respectivamente (**Tabela 16**). Isto é, a melhor atividade antiproliferativa obtida para essa linhagem de célula foi alcançada com uma borono-tirfostina, indicando o efeito benéfico da introdução do boro na estrutura da tirfostina, comparando-se com os demais substituintes testados. Nenhum dos outros compostos, contendo outros substituintes diferentes de boro e nitro, foi capaz de danificar a atividade proliferativa das células GH3.

As moléculas **64b (NO-05)** ($G_1 = \text{CN}$, $G = 4\text{-OMe}$), **64c (NO-06)** ($G_1 = \text{CN}$, $G = 4\text{-Me}$), **64f (NO-11)** ($G_1 = \text{CN}$, $G = 3\text{-NO}_2$) e **65d (NO-13)** ($G_1 = \text{CO}_2\text{Et}$, $G = 3\text{-B(OH)}_2$) foram altamente eficientes em reduzir a capacidade proliferativa (> 80%) da linhagem de células de humanos U937, proveniente de linfoma histocítico. Nota-se, que das benzeno-vinilnitrilas com boro, apenas as derivadas de cianoacetato de etila (**65c** e **65d**) apresentaram efeito antiproliferativo sob as linhagens testadas.

Tabela 16 - Toxicidade e efeito antiproliferativo das benzeno-vinilnitrilas

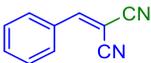
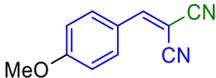
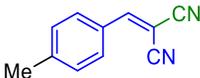
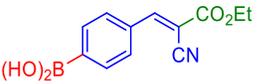
Tratamento	% proliferação depois de 72 h			
	Macrófagos peritoneais	Células J774.G8	Células GH3	Células U937
Células não tratadas	100,38 ± 0,4	99,81 ± 0,13	110,58 ± 0,05	95,43 ± 1,65
0,1% Triton X-100	12,77 ± 1,01	16,64 ± 1,18	14,40 ± 2,5	13,07 ± 2,22
65a (NO-01)^a	99,51 ± 0,33	100,44 ± 0,11	100,07 ± 0,4	98,10 ± 1,04
65b (NO-03)^a	100,05 ± 0,12	99,70 ± 0,07	99,80 ± 0,3	96,31 ± 1,33
64a (NO-04)^a	99,35 ± 0,56	102,68 ± 0,03	50,13 ± 3,5	91,01 ± 3,08
64b (NO-05)^a	105,75 ± 0,1	100,65 ± 0,06	99,40 ± 1,09	17,87 ± 2,79
64c (NO-06)^a	99,69 ± 0,06	102,53 ± 0,05	93,28 ± 1,88	16,28 ± 1,36
64d (NO-07)^a	100,43 ± 1,26	94,65 ± 0,08	99,78 ± 0,8	92,01 ± 2,8
64e (NO-08)^a	100,52 ± 0,47	100,25 ± 0,02	97,75 ± 0,06	97,23 ± 1,51
64f (NO-11)^a	99,59 ± 0,22	100,23 ± 0,15	23,56 ± 2,11	14,29 ± 3,32
65c (NO-12)^a	99,37 ± 0,71	99,93 ± 0,44	32,87 ± 1,93	82,95 ± 3,71
65d (NO-13)^a	99,38 ± 0,46	98,95 ± 0,2	100,20 ± 0,99	18,95 ± 0,52

- Ácidos borônicos em vermelho; ^a[NO] = 100 µM. As células de macrófagos peritoneais de camundongo, J774.G8 de camundongo, GH3 de rato e U937 de humanos, foram tratadas com os compostos NO na concentração 100 µM por 72 h. Os dados relatados representam a média ± DP de 4 experimentos independentes.

As moléculas **64a**, **64b**, **64c**, **64f**, **65c** e **65d**, que apresentaram efeito antiproliferativo nas linhagens GH3 e/ou U937, foram escolhidas para testes posteriores. As linhagens GH3, U937 e de macrófagos peritoneais foram expostas, separadamente, a diferentes concentrações [1 nM a 10 mM] de cada composto escolhido. Os resultados obtidos foram representados graficamente em curvas dose-resposta. Através destes testes, foi possível a determinação da concentração inibitória de 50% dos indivíduos (IC₅₀). A linhagem de

macrófagos peritoneais foi utilizada como controle. Os resultados podem ser encontrados na **tabela 17**. Os altos valores de IC_{50} , obtidos para a linhagem de macrófagos peritoneais, dos compostos **64a (NO-04)**, **64b (NO-05)** e principalmente do **64f (NO-11)** ($372,31 \mu\text{M}$) e do **65c (NO-12)** ($387,87 \mu\text{M}$), revelam como essas células são resistentes às moléculas testadas. Altos valores de IC_{50} para células benignas são altamente favoráveis. Indicam a necessidade de altas concentrações da molécula testada para que haja dano. Já os compostos **64c (NO-05)** e **65d (NO-13)** apresentaram, relativamente, valores mais baixos, mas ainda assim, aceitáveis.

Tabela 17 - Efeito dose-resposta das benzeno-vinilnitrilas frente à proliferação de células de mamíferos

Produto	Estrutura	Macrófagos peritoneais IC_{50} (μM)	Células GH3 IC_{50} (μM)	Células U937 IC_{50} (μM)
64a (NO-04)		$99,63 \pm 8,54$	$0,29 \pm 0,01$	-
64b (NO-05)		$147,77 \pm 14,73$	-	$0,88 \pm 0,02$
64c (NO-06)		$41,87 \pm 8,76$	-	$0,69 \pm 0,07$
64f (NO-11)		$372,31 \pm 11,08$	$0,12 \pm 0,06$	$0,47 \pm 0,08$
65c (NO-12)		$387,87 \pm 7,28$	$0,14 \pm 0,09$	-
65d (NO-13)		$78,91 \pm 6,45$	-	$9,83 \pm 1,07$

Relação dose-resposta para os análogos de nitrila. A linha de células GH3 de rato foi tratada com 64a, 64f e 65c. A linhagem U937 foi tratada com 64b, 64c, 64f e 65d. A linha de macrófagos peritoneais foi tratada com todos os compostos citados acima. Para todas as células testadas, as concentrações variaram de 1 nM a 10 mM por 72 h. A citotoxicidade foi medida usando a redução da resazurina em resorufina como índice proliferativo. Os dados relatados representam a média \pm DP de 4 experimentos independentes.

Os valores de IC_{50} dos derivados **64a (NO-04)**, **64f (NO-11)** e **65c (NO-12)**, testados nas células GH3, foram $0,29 \pm 0,01 \mu\text{M}$, $0,12 \pm 0,06 \mu\text{M}$ e $0,14 \pm 0,09 \mu\text{M}$, respectivamente

(Tabela 17). O ácido borônico **65c** (NO-12) (G1 = CO₂Et, G = 4-B(OH)₂) e o composto nitrado **64f** (NO-11) foram extremamente potentes frente à célula GH3, apresentando IC₅₀ na mesma ordem de grandeza do composto padrão resveratrol **66** (Figura 58). Além disso, os IC₅₀ para células GH3 foram, aproximadamente, 2700 vezes menores que os IC₅₀ para macrófagos peritoneais. Apesar da alta eficiência do composto **64a** (NO-04) (G1 = CN, G = H), sem substituinte no anel aromático, seu efeito foi inferior aos outros dois compostos testados. Esses dados sugerem que a presença de grupos doadores ou receptores de ligação de hidrogênio é importante para o reconhecimento molecular desses compostos. Através dos resultados obtidos pelo teste de dose-resposta para as células GH3, é possível inferir a relevância dos ácidos borônicos como candidatos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de tumor pituitário.

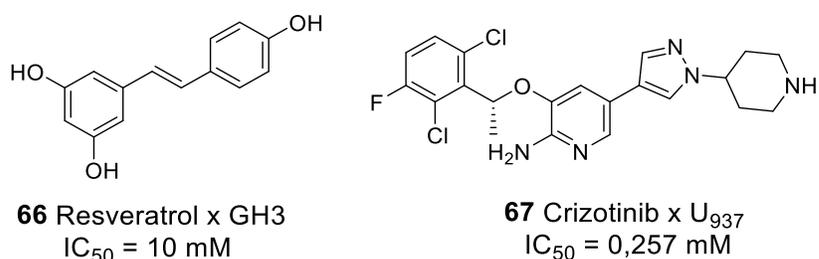


Figura 58 - Compostos padrão para as linhagens GH3 e U937

Na linhagem de células U937 de humanos, foram testados os compostos: **64b** (NO-05), **64c** (NO-06), **64f** (NO-11) e **65d** (NO-12) que apresentaram, respectivamente, os seguintes valores de IC₅₀ 0,88 ± 0,02 μM, 0,69 ± 0,07 μM, 0,47 ± 0,08 μM e 9,83 ± 1,07 μM (Tabela 17). Todos os compostos apresentaram valor de IC₅₀ menor do que o observado pelo composto padrão Crizotinib **67** (Figura 58). As eficácias dos compostos **64b** (G1 = CN, G = 4-OMe), **64c** (G1 = CN, G = 4-Me) e **64f** (G1 = CN, G = 3-NO₂) foram parecidas, por outro lado, o ácido borônico **65d** (G1 = CO₂Et, G = 3-B(OH)₂) demonstrou uma potência menor. Apesar do resultado, a estrutura dessa molécula pode servir como protótipo para o desenvolvimento de outros ácidos borônicos com maiores potências. Através dos dados expostos na tabela 17, nota-se que os valores de IC₅₀ de macrófagos peritoneais foram 60 a 2700 vezes superiores aos obtidos para as linhagens malignas, dependendo do derivado avaliado. Surpreendentemente, apenas o composto **64f** (NO-

11) apresentou atividade significativa para ambas as linhagens, GH3 e U937. Esse resultado aponta para um mecanismo hipotético geral de ação. Além disso, esse derivado foi o mais potente nas duas linhagens (**Tabela 17**). Em comparação, a linhagem de células primárias de macrófagos peritoneais foi extremamente resistente ao **64f**. Possivelmente, os compostos **64a (NO-04)** e **65c (NO-12)**, seletivos para células GH3, reduzem a proliferação dessas células ao atuar sobre a EGFR e/ou a Ras.²⁷⁴

Os compostos **64b** e **64c** inibiram potentemente a proliferação das células U937. O composto **65d (NO-13)**, demonstrou seletividade para a linhagem U937, apesar da baixa potência. Esse tipo celular expressa tirosinas quinases como EGFR²⁷⁵, FES²⁷⁶ e SYK²⁷⁷ que são possíveis alvos para as moléculas **64b**, **64c** e **65d**.

4.3.2. Análise de atividade antiparasitária *in vitro*

Todas as benzeno-vinilnitrilas sintetizadas também foram testadas quanto sua atividade antiparasitária. Investigou-se a viabilidade dos parasitas mediante tratamento com as moléculas sintetizadas em culturas *in vitro* de *T. cruzi* na forma epimastigota, em comparação com o benznidazol **18**. A cepa Y foi tratada por 72 h com 100 µM de solução das benzeno-vinilnitrilas, e sua viabilidade após 72 h foi quantificada pelo teste MTT **68** (Brometo azul de tetrazólio/Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). O teste MTT é um ensaio colorimétrico usado para avaliar a viabilidade celular. Células ou organismos metabolicamente viáveis possuem desidrogenases mitocondriais capazes de clivar o anel do tetrazólio. A clivagem do anel do MTT (coloração amarela) resulta na formação de cristais de *formazan* **69** (*E,Z*-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazan) de coloração azul escura, insolúvel em água (**Figura 59**). Assim, a formação do *formazan* reflete o estado funcional da cadeia respiratória. No ensaio realizado, o Triton X-100 (0,1%) e o benzonidazol (Bzd) (100 µM) foram utilizados como controle positivo para reduzir a viabilidade dos protozoários. Como controle negativo, foi utilizada a forma epimastigota não tratada.

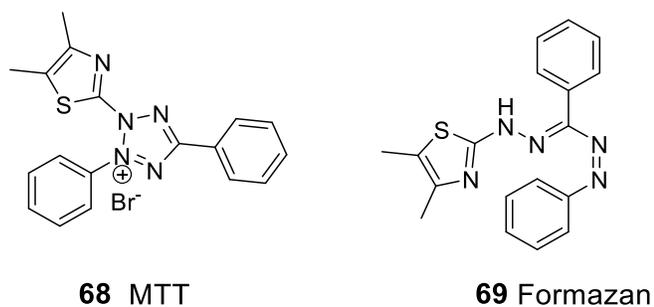


Figura 59 - Transformação do MTT em *formazan*

Não houve diferença estatística entre os valores de redução da viabilidade tripanossomas apresentados pelos compostos **65b (NO-03)** (G1 = CN, G = 3-B(OH)₂), **64a (NO-04)** (G1 = CN, G = H), **65c (NO-12)** (G1 = CO₂Et, G = 4-B(OH)₂) e **65d (NO-13)** (G1 = CO₂Et, G = 3-B(OH)₂). Entretanto, o **65c** foi a molécula mais potente, com ação similar ao controle positivo e ao tratamento com Bzd (**Figura 60**). Os derivados **64b** (G1 = CN, G = OMe) e **64c** (G1 = CN, G = Me) diminuíram a viabilidade do tripanossoma com menor eficácia que os derivados previamente citados. Já os compostos **65a** (G1 = CN, G = 4-B(OH)₂), **64d** (G1 = CN, G = NMe₂), **64e** (G1 = CN, G = Cl), e **64f** (G1 = CN, G = 3-NO₂), não promoveram a diminuição da viabilidade do tripanossoma, apresentando valores comparáveis ao controle negativo (forma epimastigota não tratada). Construíram-se curvas dose-resposta para as benzeno-vininitrilas que reduziram a viabilidade do tripanossoma na concentração 100 µM. As curvas foram obtidas após exposição das células por 24 h aos compostos avaliados. Os valores de EC₅₀ (Concentração do fármaco para induzir 50% do efeito máximo) alcançados pelos compostos **65b (NO-03)**, **64a (NO-04)**, **64b (NO-05)**, **64c (NO-06)**, **65c (NO-12)** e **65d (NO-13)** foram de 14,5 µM; 10,2 µM; 530,6 µM; 508,4 µM; 0,795 µM e 78,4 µM, respectivamente (**Figura 61**). Entre estas moléculas, o ácido borônico **65c** apresentou potência nanomolar, resultando na morte do *T. cruzi*. Apesar de menos potentes que o **65c**, os ácidos borônicos **65b** e **65d** também foram eficientes em reduzir a viabilidade do tripanossoma. Dentre os quatro ácidos borônicos testados, três apresentaram boa atividade tripanocida, sendo os compostos **65b** e **65c** os mais eficientes entre eles. Esses resultados promissores dão indícios da relevância de derivados de ácidos borônicos como protótipos na busca por novos fármacos tripanocidas mais eficientes. Ademais, os resultados parecem indicar que o

posicionamento da unidade B(OH)₂ na posição *para* com respeito à vinilnitrila melhora a eficácia da borono-tirfostina derivada do cianoacetato de etila (**65b** = **NO-12** versus **65c** = **NO-13**). Essas boronotirfostinas foram ambas mais eficientes do que aquelas derivadas da malononitrila (**65a** = **NO-01** e **65b** = **NO-03**). O valor de EC₅₀ do **65c** (**NO-12**) (0,795 μM) é 20 vezes superior ao EC₅₀ descrito para benzonidazol **18** (EC₅₀ = 20,63 μM)²⁷⁸ e 4 vezes superior ao EC₅₀ do nifurtimox **19** (EC₅₀ = 3,5 μM)²⁷⁹ para a forma epimastigota (**Figura 62**). Esses dois compostos são utilizados atualmente no tratamento de Doença de Chagas. O composto **65c** demonstrou potência menor que o bortezomibe²⁸⁰ e o DDD85646,²⁸¹ ambos inibidores potentes de proteases com atividade tripanocida frente ao *T. brucei*. Possivelmente, a mudança de cepas e/ou um mecanismo de ação distinto, uma vez que são espécies diferentes que assumem formas distintas, sejam as causas para essa diferença de valores.

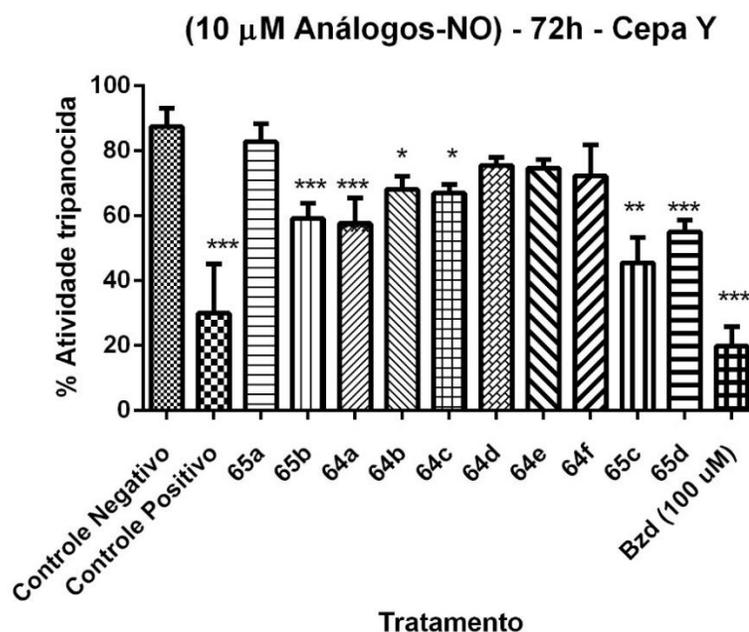


Figura 60 - Atividade tripanocida. As formas epimastigotas da cepa Y foram tratadas com os NOs, todos na concentração 10 μM por 72 h. O gráfico representa tratamentos em triplicata em 4 dias diferentes. ***p < 0,01 relativo ao controle negativo, *p < 0,05 relativo ao controle negativo; S.D.S. sem diferença estatística em relação ao controle positivo ou Bzd-benznidazol

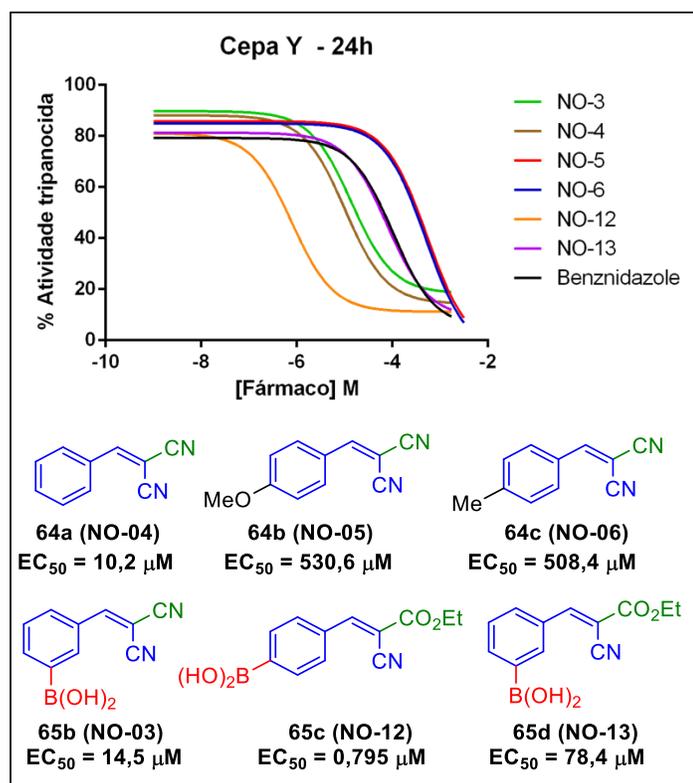


Figura 61 - Atividade tripanocida. As formas epimastigotas da cepa Y foram tratadas com os NOs, todos na faixa de concentração 1 nM -1 mM por 24 h. Gráfico representa tratamentos em triplicata em 4 dias diferentes

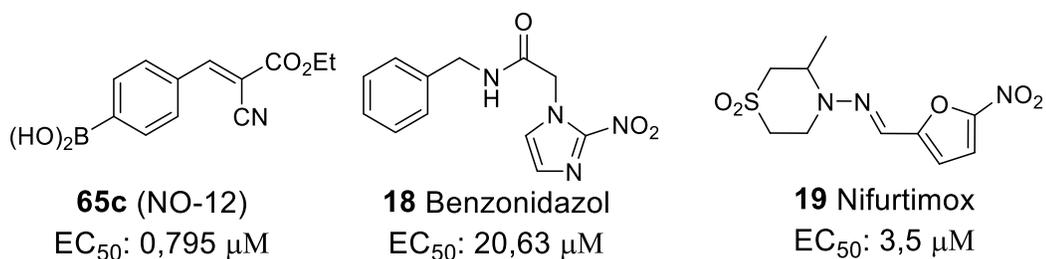


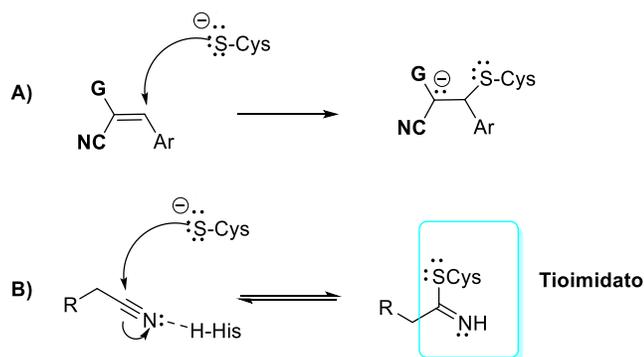
Figura 62 - Estrutura do composto **65c**, dos compostos utilizados no tratamento da Doença de Chagas e seus respectivos EC₅₀ sobre a cepa Y

Apesar desse trabalho ter sido focado na possibilidade de inibição da tirosina quinase para obtenção de atividade tripanocida, outros alvos moleculares importantes para o *T. cruzi* podem estar envolvidos no mecanismo de ação da tirfostinas sintetizadas. Diferentes proteassomas e proteases surgiram como alvos moleculares em potencial

desde a descoberta da importância dessas estruturas nos caminhos metabólicos de protozoários.^{281, 282} Por exemplo: serino-proteases estão envolvidas no mecanismo de invasão celular do hospedeiro; metalopeptidases e proteassomas (treonino-proteases) também estão correlacionadas com a virulência do parasita.²⁸³ Ácidos arilborônicos são capazes de mimetizar o estado de transição de serino e treonino-proteases, uma vez que o boro se liga fortemente a nucleófilos de oxigênio, como as hidroxilas presentes no sítio ativo de serino e treonino proteases. Existem diferentes relatos sobre a inibição de proteases por ácidos arilborônicos e outras classes de organoboros.^{213,284}

A cruzaina é uma cisteíno-protease com papel essencial na virulência do *T. cruzi*. Essa protease é considerada um importante alvo no desenvolvimento de agentes antichagásticos, pois está presente em todas formas de vida do parasita.²⁸⁵ Sabe-se que vinilsulfonas funcionam como inibidores irreversíveis da cruzaina.²⁸⁶ Essa classe de moléculas é aceptoras de Michael, assim como as tirfostinas sintetizadas nesse trabalho. Nesse caso, a cruzaina pode interagir com as benzeno-vinilnitrilas através de seu grupamento tiol localizado no sítio ativo. O tiol, ao atacar o carbono vinílico, promove a formação de uma ligação S-C entre a enzima e seu inibidor (**Esquema 20 A**).

Outra forma possível de interação entre a cruzaina e as tirfostinas é através da nitrila, como ocorre com as dipeptidilnitrilas. As dipeptidilnitrilas são conhecidos inibidores das cisteíno proteases.²⁸⁷ Nesse caso, o grupamento tiol presente no sítio ativo da enzima interage com a nitrila presente na dipeptidilnitrila, resultando em um intermediário tioimidato (**Esquema 20 B**). Portanto, em princípio, as nitrilas das tirfostinas sintetizadas podem ser um ponto de interação com a cruzaina.



Esquema 20 - Possíveis interações entre a cruzaina e as tirfostinas sintetizadas

De acordo com os resultados obtidos, as tirfostinas derivadas de ácidos borônicos apresentaram um perfil de atividade melhor do que o observado para as tirfostinas sem o boro. Provavelmente, se a cruzaina for de fato um alvo para as tirfostinas com o boro sintetizadas nesse trabalho, o grupamento borônico deverá agir como um grupo auxofórico.

4.3.3. Avaliação *in vitro* da atividade inibitória do receptor P2X7 (P2X7R) pelas tirfostinas preparadas

As benzeno-vinilnitrilas sintetizadas foram avaliadas quanto a sua capacidade de inibir (efeito antagonista) o funcionamento do P2X7R. Para isso, realizou-se um ensaio de permeabilização celular induzida por ATP. De forma geral, macrófagos peritoneais de camundongo foram pré-incubados por 10 min com os diferentes compostos analisados, com o BBG (*Brilliant Blue G*) e o A740003. Em seguida, as células foram tratadas com uma dose de 5 mM de ATP por 25 min. Nos 5 min finais, uma dose ou do corante iodeto de propídeo (PI) ou brometo de etídio (EB) foi administrada. O tratamento com ATP nessa concentração induz à abertura do poro associado a este receptor. Dessa forma, íons e moléculas orgânicas de até 900 Da (como o iodeto de propídeo) podem passar pela membrana e entrar no citoplasma. O iodeto de propídeo e o brometo de etídio são intercalantes de DNA, comumente usados como marcadores fluorescentes. Esses corantes, ao entrarem em contato com ácidos nucleicos, emitem luz fluorescente que pode ser medida por métodos analíticos. O BBG e o A740003 foram utilizados nos testes como padrões para o efeito antagonista sobre o receptor P2X7 de camundongo (cP2X7R) e de humano (hP2X7R). Os testes iniciais foram realizados em macrófagos peritoneais devido à facilidade de obtenção e por se aproximarem mais ao sistema real. O efeito antagonista dos compostos testados pode ser encontrado na **tabela 18**.

Tabela 18 - Efeito antagonista dos inibidores de P2X7R e da série de compostos **NO** frente à captação de corante induzida por ATP em macrófagos peritoneais

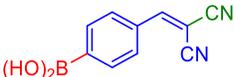
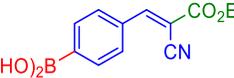
Inibidores do P2X7R e série NO	cP2X7 IC ₅₀ (µM)
BBG	15,23 ± 1,65
A740003	0,897 ± 1,12
65a (NO-01)	0,639 ± 0,11
65b (NO-03)	46,88 ± 5,24
64a (NO-04)	11,84 ± 2,08
64b (NO-05)	75,44 ± 4,55
64c (NO-06)	102,3 ± 3,02
64d (NO-07)	88,41 ± 5,47
64e (NO-08)	6,61 ± 0,41
64f (NO-11)	54,68 ± 4,77
65c (NO-12)	0,939 ± 0,21
65d (NO-13)	91,02 ± 1,33

Valores são a média de 2-4 experimentos. Compostos foram testados em macrófagos peritoneais de camundongo. Os valores de IC₅₀ = Concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo foram obtidos através de curvas de concentração-resposta. cP2X7R = P2X7R de camundongos

Os compostos **65b (NO-03)**, **64b (NO-05)**, **64c (NO-06)**, **64d (NO-07)**, **64f (NO-11)** e **65d (NO-13)**, tiveram valores de IC₅₀ superiores ao BBG e ao A740003. Os IC₅₀ dos compostos **64a** (G = CN, G₁ = H) e **64e** (G = CN, G₁ = Cl) apresentaram valores entre os obtidos pelo BBG e A740003. Já os compostos **65a** (G = CN; G₁ = 4-B(OH)₂) e **65c** (G = CO₂Et; G₁ = 4-B(OH)₂) demonstraram uma eficiência inibitória maior que dos outros compostos da série **NO**, do que o BBG (IC₅₀ = 15,23 µM) e similar ao A740003 (IC₅₀ = 0,897 µM) (**Tabela 19**). Seus valores de IC₅₀ foram de 0,639 µM e 0,939 µM, respectivamente. Esses valores são similares ao de outras moléculas inibidoras de P2X7R descritas na literatura.^{42b,118a} Apenas as borono-tirfostinas **65a** e **65c** apresentaram potência comparável com inibidores de P2X7R comerciais. Portanto, as moléculas restantes não foram selecionadas para testes posteriores.

Construíram-se curvas dose-resposta medindo-se a toxicidade celular dos compostos **65a** e **65c** em macrófagos peritoneais após 72 h de tratamento. Ambos compostos apresentaram baixa toxicidade com altos valores de CC_{50} (concentração citotóxica). O valor de CC_{50} do composto **65a (NO-01)** ($CC_{50} = 443 \mu\text{M}$) foi mais alto do que o observado para o BBG ($CC_{50} = 85,62 \mu\text{M}$) e A740003 ($CC_{50} = 351 \mu\text{M}$), indicando que a benzenovinilnitrila testada é menos tóxica que os antagonistas padrão. O CC_{50} do **65c (NO-12)** ($CC_{50} = 443 \mu\text{M}$) foi muito maior que do o CC_{50} do BBG e similar ao do A740003 (**Tabela 19**). Quando comparados, o índice de seletividade (S.I.) dos ácidos borônicos (boronotirfostinas) foi maior do que os exibidos pelos inibidores comerciais de P2X7R (BBG e A740003) (**Tabela 19**). O análogo **65c** (S.I. = 392,8) exibiu valores de S.I. similares ao inibidor seletivo de P2X7R, o A740003 (S.I. = 391,4). Já o S.I. do análogo **65a** (S.I. = 693,2), foi 1,77 vezes maior que o composto A740003, indicando uma atividade promissora. Para obter mais informações sobre os análogos de ácidos borônicos, outros testes foram realizados. Curiosamente, os compostos sintetizados apresentaram valores de IC_{50} maiores do que outros inibidores de P2X7R já descritos na literatura. Entretanto, em razão do elevado S.I. obtido, esse análogo de ácidos arilborônicos permanecem como bons candidatos.

Tabela 19 - Toxicidade celular e seletividade dos inibidores de P2X7R e dos análogos de ácidos arilborônicos

Antagonistas do P2X7R e ácidos arilborônicos	Estrutura	cP2X7 CC_{50} (μM) (macrófagos)	Índice de seletividade ($^aCC_{50}/IC_{50}$)
BBG	-	$85,62 \pm 2,77$	5,62
A740003	-	$351,1 \pm 11,76$	391,4
65a (NO-01)		$443 \pm 25,7$	693,2
65c (NO-12)		$329,6 \pm 16,68$	392,8

^a CC_{50} (concentração citotóxica) foi obtida por curvas de concentração-resposta.

Outra forma de medir a inibição da funcionalidade do receptor é através da liberação de IL-1 β , uma vez que, a liberação desta citocina, induzida por ATP, é uma função característica da ativação do P2X7R. Esse método foi aplicado em macrófagos peritoneais selvagens de camundongo e na linhagem de células monocíticas de humanos, THP-1.

O composto **65a** inibiu potentemente a liberação de IL-1 β induzida por ATP no P2X7R de camundongo ($IC_{50} = 0,042 \mu M$) e de humano ($IC_{50} = 0,021 \mu M$), entretanto, o **65c** inibiu fracamente a liberação de IL-1 β mediada pela ativação do cP2X7R ($IC_{50} = 0,537 \mu M$) (**Tabela 20**). A diferenciação das células monocíticas de humanos THP-1 em macrófagos M1, foi promovida pela utilização de INF- γ (Interferon gamma) e PMA (*phorbol-12-myristate acetate*) e pela incubação com LPS (lipopolissacarídeo) por 4 horas. O ATP só foi adicionado nos últimos 30 minutos de incubação com LPS e os ácidos borônicos foram adicionados 30 minutos antes da adição de ATP. Os compostos **65a (NO-01)**, e **65c (NO-12)** apresentaram uma potência maior/ou similar que o BBG e o A740003 em inibir a liberação de IL-1 β mediada por hP2X7R (**Figura 63 A**). A liberação da IL-1 β induzida por ATP em camundongo, também foi inibida pelos análogos de ácido borônico (**Figura 63 B**). No caso do **65c (NO-12)**, houve uma redução de inibição em comparação com a inibição do hP2X7R ($IC_{50} = 0,243 \mu M$). Por outro lado, o **65a (NO-01)** manteve uma potência de inibição do cP2X7R elevada, inclusive com valores de IC_{50} menores do que o observado para o antagonista de referência A740003 (**Figura 63, Tabela 20**). Os dois análogos também inibiram a liberação de IL-1 β induzida por BzATP (2'3'-(benzoil-4-benzoil)-adenosina-5'-trifosfato), entretanto, esses dados não serão descritos e detalhados no presente trabalho encontram nesse trabalho. Esses resultados indicam um mecanismo seletivo de inibição da liberação IL-1 β mediada por ativação do P2X7R, como ocorre com outros antagonistas de P2X7R relatados na literatura.^{42b, 288}

Tabela 20 - Avaliação do efeito inibitório dos análogos de ácidos borônicos e dos antagonistas do P2X7R através da avaliação da diminuição da captação de PI em células HEK 293 e da liberação de IL-1 β em células THP-1 e macrófagos de camundongos

Antagonistas do P2X7R e ácidos arilborônicos	Captação de PI em células HEK293 transfectadas com hP2X7R IC ₅₀ (μ M)	Liberação de IL-1 β em células THP-1 IC ₅₀ (μ M)	Liberação de IL-1 β em macrófagos peritoneais de camundongo IC ₅₀ (μ M)
BBG	4,97 \pm 0,62	0,783 \pm 0,063	0,907 \pm 0,077
A740003	0,129 \pm 0,041	0,087 \pm 0,031	0,114 \pm 0,02
65a (NO-01)	0,031 \pm 0,002	0,021 \pm 0,011	0,042 \pm 0,013
65c (NO-12)	0,105 \pm 0,011	0,243 \pm 0,034	0,537 \pm 0,065

PI = Iodeto de propídeo; hP2X7 = P2X7 humano; THP-1: linhagem de monócito humano derivada de paciente com leucemia monocítica aguda.

Células HEK 293 não expressam naturalmente receptores da família P2X. Alguns dos receptores dessa família atuam da mesma forma que o P2X7R, sendo ativados por ATP e possibilitando a passagem de moléculas orgânicas, portanto, a presença desses receptores pode interferir nos resultados obtidos. Por isso, ao transfectar o P2X7R humano em células HEK 293, obtêm-se valores de inibição oriundos unicamente do P2X7R, sem interferências. O poder inibitório dos ácidos arilborônico **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** foi medido através da captação de PI. Ambos apresentaram valores de IC₅₀ de 0,031 μ M para o **65a** e 0,15 μ M para o **65c (Tabela 20)**. Esses valores baixos demonstram a alta potência inibitória desses compostos. Inclusive, o valor de IC₅₀ dos dois foi maior do que o observado para o A740003.

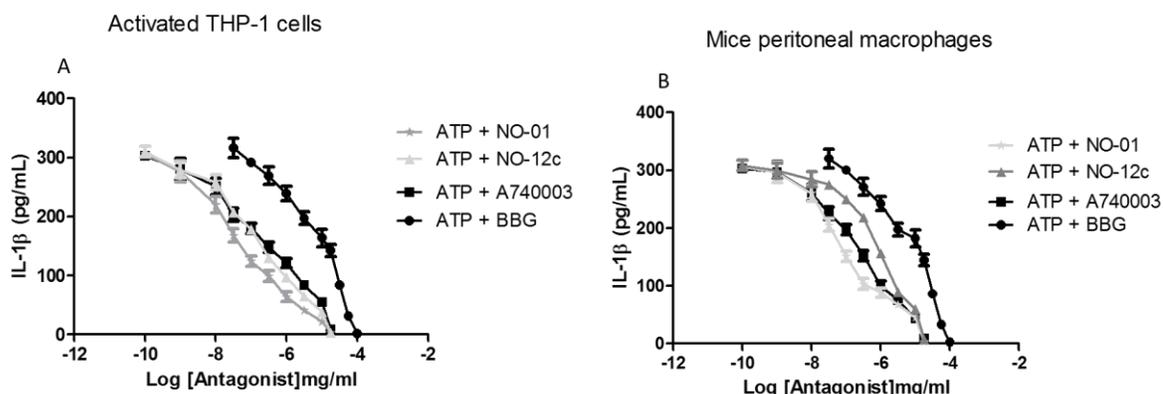


Figura 63 - Inibição da liberação de IL-1 β induzida por ATP pelos ácidos arilborônicos em células de humanos e de camundongos. A) Células diferenciadas de THP-1 foram tratadas com 1 mM de ATP (30 min) e com LPS (4 h) na presença de diferentes concentrações do BBG, A740003, **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**. B) Macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com 1mM de ATP (30 min) e LPS (4 h) na presença de diferentes concentrações de BBG, A740003, **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**. As curvas representam os valores obtidos em 3-5 experimentos independentes

Um possível mecanismo de ação para as borono-tirfostinas foi avaliado usando a técnica chamada de “*whole cell patch clamp*”. Avaliou-se através de uma curva do tipo dose-resposta a corrente induzida por diferentes concentrações de ATP em células de macrófagos peritoneais. A concentração de ATP foi variada de 100 μ M até 25 μ M na presença de 500 nM dos antagonistas A740003, **65a**, **65c** (**Figura 64 A e B**). Quando a concentração das borono-tirfostinas ou do A740003 foram fixadas em 500 nM e testadas na presença de ATP, houve um aumento do EC₅₀ em comparação com o teste apenas com o ATP. Nos testes com **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** observa-se um perfil de corrente induzida pelo ATP, parecido com aquele obtido no teste realizado com o A740003, que inibe o P2X7R ligando-se no sítio alostérico.²⁸⁹ Esses resultados sugerem um mecanismo de inibição não competitiva do P2X7R no sítio alostérico da maneira semelhante à forma como o A740003 inibe o receptor, ou uma interação irreversível no sítio de interação do ATP.

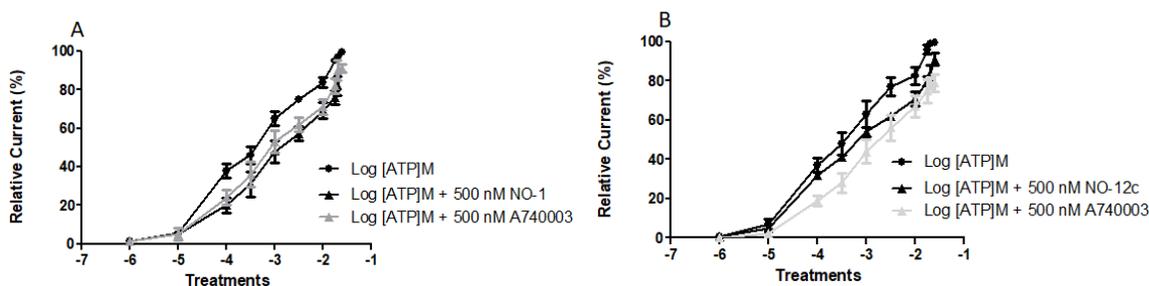


Figura 64 - Avaliação do mecanismo inibitório dos compostos **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** como antagonistas do P2X7R. Mecanismos competitivos foram avaliados através da corrente iônica em macrófagos peritoneais de camundongos onde (●) = teste apenas com ATP; (▲) = teste com 500 ng/mL de **65a (NO-01)** (A) ou **65c (NO-12)** (B) à 37 °C.

Os gráficos são a representação de 3-4 experimentos independentes

4.3.4. Teste de solubilidade, estabilidade microsossomal e permeabilidade *in vitro*

Os derivados de ácido arilborônico **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** foram moderadamente estáveis em microsomas de camundongo e de humano (**Tabela 21**). Provavelmente, o composto **65a (NO-01)** deve exibir um tempo de ação menor *in vivo* do que o **65c (NO-12)** em razão dos valores obtidos. Adicionalmente, em comparação com o propranolol, o **65a (NO-01)** foi permeável em Caco-2 com porcentagem maior que 75% e o **65c (NO-12)** apresentou permeabilidade superior a 55% (**Tabela 21**). Quando solubilizados em soluções com pH variando de 2-10, o **65a (NO-01)** apresentou solubilidade em torno de 250 μ M e o **65c (NO-12)** superior a 250 μ M (**Tabela 22**).

O coeficiente de distribuição (LogD) mede a lipofilicidade efetiva de uma molécula em um determinado pH, no caso, pH = 7,4. Quanto menor o valor de LogD, mais hidrofílica é a molécula. O composto **65a (NO-01)** apresentou uma maior hidrofílicidade ($\text{LogD}_{7,4} = -2,25 \pm 0,09$) do que o composto **65c (NO-12)** ($\text{LogD}_{7,4} = -0,96 \pm 0,11$), portanto, uma maior solubilidade em água (**Tabela 23**). A lipofilicidade reduzida do **65a (NO-01)** pode estar associada com a pequena estabilidade microsossomal, entretanto, essa característica pode aumentar a permeabilidade tecidual, como foi observado no teste com células Caco-2. Em contraste, o **65c (NO-12)** apesar de mais lipofílico, exibiu maior estabilidade microsossomal e permeabilidade tecidual reduzida.

Tabela 21- Estabilidade em microsossoma hepático (MH) e permeabilidade em Caco-2 dos compostos **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**

	^a Estabilidade em MH de camundongo	^a Estabilidade MH de humano	^b Caco-2
65a (NO-01)	20,2	19,97	76,6 ± 1,8
65c (NO-12)	36,3	35,79	59,79 ± 1,7

^a Estabilidade em microsossomas de fígado de camundongo e humano. Dados relatados como CLint ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). ^bValores de permeabilidade aparente (Papp) foram medidos usando compostos com alta e baixa permeabilidade de absorção, vinblastina e propranolol, respectivamente, como referências. Os dados são relatados em 10^6 cm/s. Os valores indicam uma direção de apical para basolateral (A-B). Os compostos foram testados ao mesmo tempo. Os valores são a média \pm D.P. de 3 experimentos.

Tabela 22 - Solubilidade de **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** em diferentes valores de pH

Composto	pH 2(a)	pH 4(b)	pH 7.4(c)	pH 10(d)
65a (NO-01)	250 μM	250 μM	<250 μM	<250 μM
65c (NO-12)	250 μM	250 μM	<250 μM	250

(a) pH 2: ácido clorídrico; (b) pH 4: tampão de citrato; (c) pH 7.4: tampão de fosfato; (d) pH 10: hidróxido de sódio, n = 3 dias distintos.

Tabela 23 - LogD_{7,4} das borono-tirfostinas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**

Composto	LogD _{7,4}
65a (NO-01)	-2.25 \pm 0.09
65c (NO-12)	-0.96 \pm 0.11

4.3.5. Docking molecular com foco no Receptor P2X7

De modo a identificar possíveis sítios de ligação ao redor das cavidades (S1, S2 e S3) encontradas no canal iônico do P2X7R (**Figura 65**) para os ligantes ativos **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**, foram realizados *dockings* moleculares às cegas para cada um deles. Esses testes *in silico* foram realizados em colaboração com o grupo do Dr. Murilo Bello na UFRJ.

Com o objetivo de obter informações sobre a relação estrutura-atividade, realizou-se o mesmo *docking* às cegas para os ligantes menos ativos **64c (NO-06)** e **65d (NO-13)**

(resultado dos testes para P2X7R no t3pico 4.3.3.). A cavidade com maior volume S1 est3 localizada dentro do poro do P2X7 e engloba o dom3nio inferior das 3 subunidades interligadas. A segunda maior cavidade 3 a S2, tamb3m localizada no poro, por3m no dom3nio superior. As cavidades S3', S3'' e S3''' s3o os s3tios de liga33o com o ATP, localizados entre as subunidades. **Figura 65** representa as cavidades identificadas e na **tabela 24** encontram-se os volumes de cada cavidade.

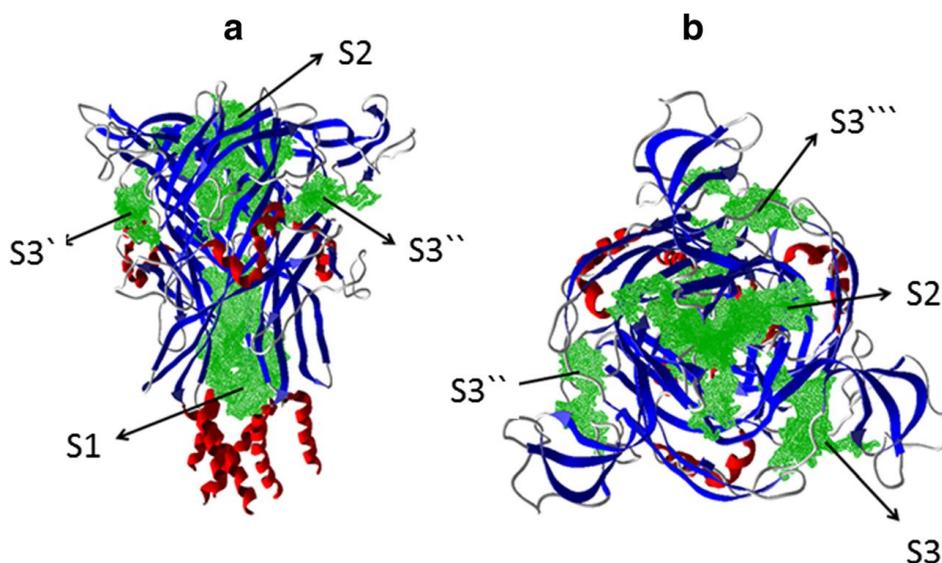


Figura 65 - Representa33o dos s3tios de intera33o (S1, S2 e S3) identificados no receptor P2X7. A) Vis3o frontal; B) Vis3o superior. As cavidades S1, S2 e S3 s3o ordenadas de acordo com seu volume. Existem tr3s s3tios de intera33o S3 id3nticos formados por 3 subunidades id3nticas, portanto, os s3tios s3o diferenciados pelas legendas S3', S3'' e S3'''

Tabela 24 - Volume das cavidades identificadas em P2X7R de humano

Cavity	Volume (Å^3)
S1	2204,67
S2	1320,96
S3'	442,88
S3''	394,24
S3'''	308,22

Os resultados do *docking* molecular indicam que a cavidade S2 é o sítio de interação mais favorável para os inibidores **65a (NO-01)**, **65c (NO-12)**, **64c (NO-06)** e **65d (NO-13)**. A cavidade S2 é a mesma revelada no trabalho de Karasawa e Kawate em 2016, onde 4 inibidores (A740003, A804598, AZ10606120, GW791343, JNJ47965567) conhecidos interagem com o receptor.²⁸⁹ As quatro benzeno-vinilnitrilas testadas apresentam um modo de interação similar na cavidade S2, onde a fenila interage com resíduos de fenilalanina 95, 103 e 293 da cadeia B. Essas interações se assemelham àquelas observadas no trabalho de Karasawa,²⁸⁹ uma vez que esses resíduos também estão envolvidos em interações hidrofóbicas. Adicionalmente, as borono-tirfostinas (**65a (NO-01)**, **65c (NO-12)**, e **65d (NO-13)**) orientam-se em direção à cadeia lateral da serina 101 da cadeia B (**Figura 66**). Apesar de todas as benzeno-vinilnitrilas interagirem da mesma maneira (interações hidrofóbicas) com os resíduos de fenilalanina, é possível que as ligações de hidrogênio com os resíduos Gln98, Leu97 e especialmente com a Ser101 sejam as responsáveis pelo aumento de atividade inibitória observada para as borono-tirfostinas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** em comparação com os **64c (NO-06)** e **65d (NO-13)**. Além dessas interações, o análogo **65c (NO-12)** apresentou ligações de hidrogênio extras com os resíduos de Gly98 e 99 da cadeia A, o que pode contribuir para a seletividade do composto. Na **figura 67** são demonstradas as interações intermoleculares entre as benzeno-vinilnitrilas analisadas e a cavidade S2 sugeridas pelo *docking* molecular.

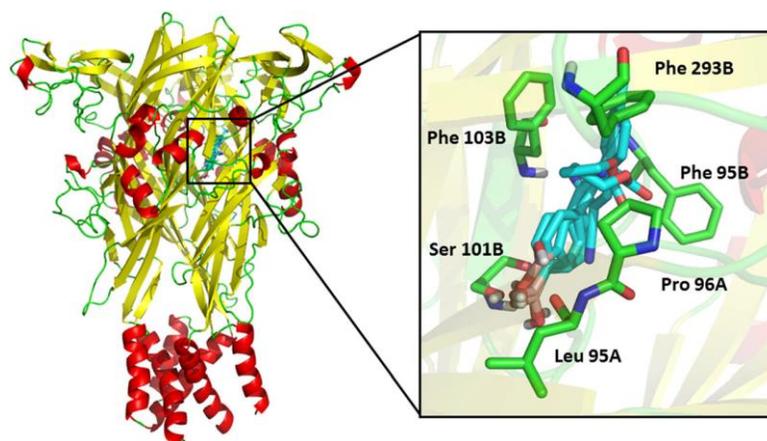


Figura 66 - Superposição dos inibidores **65a (NO-01)**, **65c (NO-12)**, **64c (NO-06)** e **65d (NO-13)** ancorados na cavidade S2. As benzeno-vinilnitrilas se encontram em azul e os principais resíduos em verde

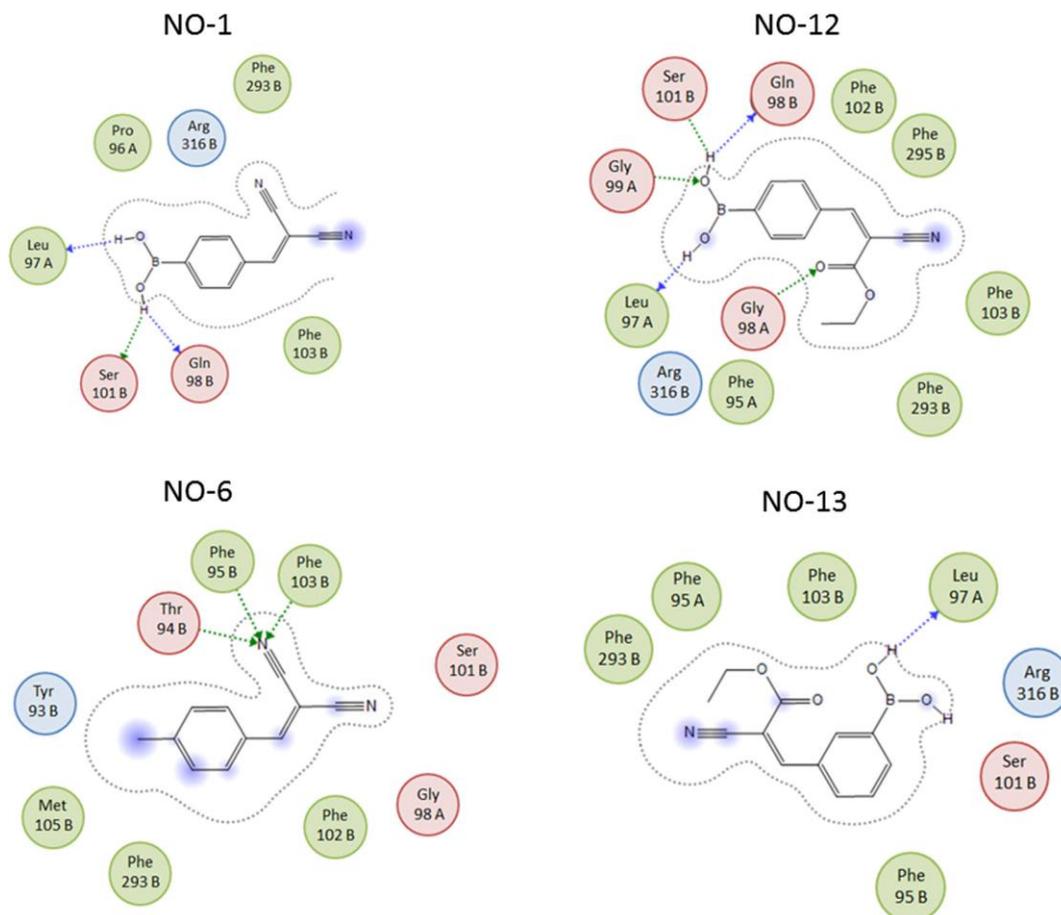


Figura 67 - Representação das principais interações intermoleculares de cada benzeno-vinilnitrila (**65a (NO-01)**, **65c (NO-12)**, **64c (NO-06)** e **65d (NO-13)**) avaliada na cavidade S2, identificadas por *docking* molecular. As setas indicam as ligações de hidrogênio e as áreas em azul, a exposição ao solvente

4.3.6. Estudo ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade)

A análise do perfil farmacocinético e toxicológico das borono-tirfostinas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** foi avaliada utilizando o programa ADMET Predictor® (Simulation Plus) pelo grupo de pesquisa do Dr. Murillo Bello da UFRJ. Após a administração por via oral, o fármaco deve ser absorvido e solubilizado durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Assim, um bom candidato a fármaco deve apresentar uma facilidade de ser absorvido. Quando isso não é possível, outros métodos mais inconvenientes de

administração (ex.: injeção) devem ser considerados. Idealmente, a administração oral é priorizada.

Os estudos *in silico* têm papel crucial na pesquisa e desenvolvimento de fármacos, em razão de sua capacidade de avaliar as propriedades físico-químicas e farmacocinéticas de substâncias bioativas. Os resultados *in silico* obtidos através do teste de absorção intestinal humana (do inglês, *Human Intestinal Absorption* - HIA), indicam uma alta permeabilidade para os compostos avaliados (**65a** e **65c**).²⁹⁰ Através do teste de absorção intestinal em células Caco-2 (Adenocarcinoma de cólon humano), estimou-se uma absorção de 70% e uma alta permeabilidade, maior que 8×10^6 cm/s.²⁹¹ Do mesmo modo, foi estimada uma alta solubilidade em água para os dois compostos **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** com valores de logS de -2,04 e -2,20, respectivamente. Por outro lado, apenas o **65a** apresentou alta penetração na membrana hematoencefálica.

O perfil metabólico das enzimas CYP também foi investigado, onde os análogos **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** apresentaram potencial de interação apenas com a CYP3A4, como inibidores. Essa classe de proteínas representa 75% das enzimas responsáveis por metabolizar fármacos. Grande parte dos fármacos são desativados pelas CYPs através da conversão de um grupamento bioativo, o que acelera a velocidade de eliminação destes. Portanto, neste caso, o baixo potencial de interação é favorável para a manutenção da atividade biológica dos dois compostos. Além disso, sabe-se também que, a maioria dos fármacos contendo grupos nitrila não são atacados nestes grupos pelas enzimas, de forma que são eliminados inalterados. Não obstante, a epoxidação de alceno-nitrilas (caso dos compostos analisados) pode, potencialmente, liberar cianeto, embora, o grande número de fármacos aprovados, contendo esse grupo, parecem indicar que é mais provável a metabolização em outro local.²⁹²

Em relação aos parâmetros toxicológicos, os compostos avaliados foram classificados com inibidores fracos ($pIC_{50} \leq 6.0$ mol/L) pelo teste de inibição do hERG (do inglês, *Human Ether-a-go-go-Related Gene*). Esse resultado é extremamente favorável, uma vez que, a inibição desses canais pode causar morte súbita (hERG).²⁹³ Além disso, os compostos demonstraram um baixo potencial mutagênico pelo teste AMES e, por fim, nenhuma característica carcinogênica foi identificada pelo teste *Carcinogens*.²⁹⁴ Com relação à porção B(OH)₂, não há nenhuma toxicidade aparente identificada na literatura.

De fato, o Bortezomibe (Velcade), primeiro fármaco derivado de ácido borônico aprovado pela FDA (*Federal Drug Administration*) para o tratamento de mieloma múltiplo, apresenta baixa toxicidade. Na eventual metabolização dos compostos contendo a unidade $B(OH)_2$, o ácido bórico, composto com baixa toxicidade para humanos, é geralmente formado.²⁹⁵

4.3.7. Avaliação *in vivo* da atividade anti-inflamatória dos compostos 65a e 65c

Tendo em vista a capacidade excelente das borono-tirfostinas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** *in vitro* a liberação de IL-1 β mediada pela ativação do P2X7R, e o importante papel do P2X7R nos processos inflamatórios, avaliaram-se as propriedades anti-inflamatórias *in vivo* desses compostos. As propriedades foram avaliadas utilizando-se o modelo de edema de pata induzido por ATP em camundongo. Diclofenaco de sódio e as borono-tirfostinas foram administrados intraperitonealmente uma hora antes do tratamento com ATP por 30 min. Utilizou-se como padrão de inibição da resposta inflamatória induzida por ATP, o ATP oxidado (ATPox), um antagonista irreversível, e o diclofenaco (Diclofenac), um anti-inflamatório geral. Ambos inibiram o edema na pata (**Figura 68**). As borono-tirfostinas também inibiram eficientemente o edema. O composto **65a (NO-01)** inibiu mais efetivamente a resposta inflamatória que o ATPox e o diclofenaco em concentrações menores (**Figura 68 A**). Já o **65c (NO-12)** promoveu um efeito anti-inflamatório similar aos padrões em uma concentração menor (**Figura 68 B**). Em concordância com as análises *in vitro*, o análogo **65a (NO-01)** inibiu o edema de pata induzido por ATP com maior potência do que o análogo **65c (NO-12)**.

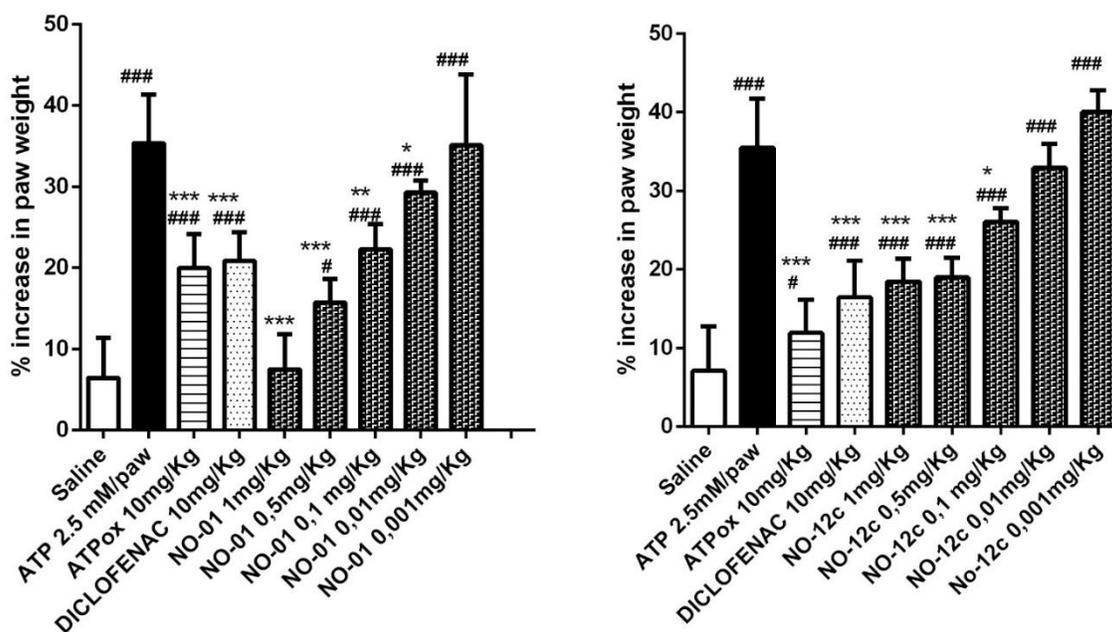


Figura 68 - Efeito anti-inflamatório em edema de pata induzido por ATP dos compostos **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**. Grupos de 5 camundongos da linhagem Swiss Webster foram tratados com ATP intraplantar ou pré-incubados por 30 min com diclofenaco (10 m/kg), ATP oxidado (10mg/kg), ou doses de **65a (NO-01)** (0,001–1 mg/kg) (A) ou **65a (NO-01)** (B) e depois tratados com ATP. O edema da pata foi medido 60 minutos após a aplicação do ATP. Os dados relatados representam a média \pm DP de experimentos realizados em 3 dias distintos. ### P<0, 05 comparação em relação ao grupo salino. *** P < 0,05 comparação com relação ao grupo ATP

5. CONCLUSÕES

Constatou-se que a condensação de Knoevenagel em meio aquoso é um excelente protocolo para obtenção de benzeno-vinilnitrilas contendo boro, uma vez que, esses compostos foram obtidos com elevada pureza, sem a necessidade de utilização de solventes orgânicos, inclusive nos procedimentos de isolamento. Os compostos *E*-arilcianovinílicos inéditos (borono-tirfostinas) foram obtidos com rendimentos elevados (84-91%). As tirfostinas sem o boro foram sintetizadas através da reação em água entre diferentes aldeídos e a malononitrila (R = 81-98%).

Os pontos de fusão das benzeno-vinilnitrilas sem o boro, coincidem com os valores encontrados na literatura. Quanto às borono-benzeno-vinilnitrilas, somente foi possível determinar o ponto de decomposição ao invés do ponto de fusão.

Todos os compostos foram caracterizados por espectroscopia na região do IV e por ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C . De uma forma geral, assim como a presença do grupo nitro fortemente retirador causa o fortalecimento da ligação CN, conforme verificado no espectro de IV, os ácidos borônicos comportam-se de forma semelhante. Verificou-se que através do protocolo de reação e de isolamento aquoso, os compostos de boro foram obtidos sob a forma dos ácidos borônicos e não dos respectivos anidridos cíclicos (boroxinas) devido à presença da banda em $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ característica do estiramento do OH e à ausência da banda forte de estiramento de B-O de anidridos em $680\text{-}705\text{ cm}^{-1}$. Este fato evidenciou a presença do boro nas estruturas, o que foi corroborado pela presença dos H's da hidroxila no espectro de ^1H RMN e pela ausência do sinal do carbono ligado ao boro no espectro de RMN de ^{13}C . Tais informações significam que o procedimento aquoso não resultou em protodesboronação, sendo adequado à síntese de compostos de boro.

Adicionalmente, a análise de ^1H RMN apenas nos permite identificar a presença de um estereoisômero para as borono-tirfostinas derivadas do ácido cianoacetato de etila. A análise de raio-X de monocristal destes compostos permitiu determinar a estereoquímica dos mesmos como *E*.

A análise dos cristais das borono-tirfostinas obtidas evidenciou que a rede cristalina é mantida, principalmente, por meio das ligações de H. Os compostos onde a unidade $\text{B}(\text{OH})_2$ estava na posição *meta*, devido ao impedimento espacial, geraram cristais menores, com ligações de hidrogênio mais fracas e com maiores torções dos diedros do que os análogos *para*-substituídos.

A estratégia de unir ácidos borônicos com as tirfostinas na mesma molécula resultou em boas atividades biológicas. O **65c (NO-12)** ($\text{G1} = \text{CO}_2\text{Et}$ e $\text{G} = 4\text{-B}(\text{OH})_2$) apresentou um excelente potencial antiproliferativo ($0,14 \pm 0,09\ \mu\text{M}$) para células da linhagem GH3, proveniente de tumor pituitário de rato. O composto **65d (NO-13)** ($\text{G1} = \text{CO}_2\text{Et}$ e $\text{G} = 3\text{-B}(\text{OH})_2$), apesar de menos eficiente em comparação com as benzeno-vinilnitrilas **64b (NO-05)** (4-MeO), **64c (NO-06)** (4-Me) e **64f (NO-11)** (3- NO_2), também exibiu atividade

antiproliferativa contra a linhagem de células U937, originária de linfoma histocítico de humano.

Os estudos de quimiogenômica reforçam a teoria de que a família de proteínas quinases, particularmente, as tirosinas quinases, são possíveis alvos moleculares para os compostos sintetizados em linhagens de células malignas. Dentre as tirosinas quinases identificadas como possíveis alvos nesse estudo, a DYRK1a apresentou-se como um alvo promissor, devido ao seu papel no desenvolvimento do câncer e na regulação da EGFR.

Já os estudos de *docking* molecular com a tirosina quinase DYRK1a, indicam que os compostos contendo a unidade $B(OH)_2$ como o **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**, podem interagir com o sítio ativo dessa proteína.

No que tange à atividade anti-chagásica *in vitro*, as borono-tirofostinas foram superiores às tirfostinas sem boro, demonstrando que a presença da unidade $B(OH)_2$ nestas estruturas representou um ganho para a ação antiparasitária desta classe de compostos. O Composto **65c (NO-12)** foi o mais eficiente entre eles, exibindo um EC_{50} (0,795 μM) 25 vezes menor que o obtido para o benzonidazol (20,63 μM), que é o fármaco atualmente utilizado no tratamento de Chagas.

Os resultados referentes a atividade anticâncer e tripanocida e os estudos de *docking* molecular para proteínas quinases foram publicados recentemente na revista ChemMedChem: Hiller, N. J.; e Silva, N. A. A.; Faria, R. X.; Souza, A. L. A.; Resende, J. A. L. C.; Farias, A. B.; Romeiro, N. C.; Martins, D. L. Synthesis and evaluation of anticancer and trypanocidal activities of boronic tyrophostins. *ChemMedChem* 2018, 13, 1395-1404 (**Apêndice B**).²⁵¹

Os resultados apresentados nesse trabalho evidenciam os ácidos arilborônicos como uma nova classe de inibidores de P2X7R. Vale ressaltar que, de acordo com pesquisas na literatura, é primeira vez que o potencial inibitório de ácidos arilborônicos frente ao P2X7R é avaliado.

As borono-tirfostinas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** atuaram como antagonistas potentes dos P2X7R de humano e de camundongo. O composto **65a (NO-01)** foi o mais potente tanto *in vitro* como *in vivo*. Inclusive, esse composto inibiu mais eficientemente o funcionamento do P2X7R e a resposta inflamatória do que os antagonistas conhecidos

BBG e A740003. O índice de seletividade (S.I.) calculado para estas substâncias (**65a** = 693,2; **65c** = 392,8) indicou um bom potencial para investimentos em testes futuros mais detalhados.

Os estudos ADMET *in silico* realizados para as duas moléculas que apresentaram atividade frente ao P2X7R indicam que os perfis farmacocinéticos dos compostos são aceitáveis e os efeitos toxicológicos para ambas as substâncias são baixos, sugerindo um perfil de “*druglikeness*” das moléculas.

Os resultados de *docking* molecular sugerem que os locais de interação para os compostos **65a** (**NO-01**) e **65c** (**NO-12**) estão localizados na parte superior do poro do P2X7R. Tanto o *docking* quanto o teste de “*whole cell patch clamp*” parecem indicar que as borono-tirfostinas atuam como inibidores não-competitivos, atuando sobre o sítio alostérico de forma semelhante ao do A740003.

Nos testes *in vivo* o composto **65a** foi aquele que apresentou o melhor resultado, inibindo a formação do edema de pata mais eficientemente que o diclofenaco, conhecido anti-inflamatório, e o antagonista ATPox.

Portanto, esses resultados corroboram a teoria inicial do presente trabalho que tirfostinas, associadas com a unidade B(OH)₂, apresentam um alto potencial terapêutico e podem funcionar como protótipos no desenvolvimento de uma nova classe de inibidores de P2X7R e anti-inflamatórios. Os resultados biológicos referentes à atividade como antagonista do P2X7 e ação anti-inflamatória foram publicados recentemente na revista *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*: Faria, R. X.; Hiller, N. J.; Salles, J. P.; Resende, J. A. L. C.; Diogo, R. T.; von Ranke, N. L.; Bello, M. B.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C.; Martins, D. L. Arylboronic acids inhibit P2X7 receptor function and the acute inflammatory response. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2019, 51,277-290.²⁹⁶

6. METODOLOGIA

6.1. Materiais e Métodos

Solventes e reagentes foram utilizados sem purificação prévia. Utilizaram-se os seguintes solventes: etanol, metanol, acetato de etila, diclorometano, todos da marca

Próquimios. Empregaram-se os seguintes reagentes: malononitrila (Aldrich, > 99%), cianoacetato de etila, ácido 3-formilfenilborônico (Combi-Blocks, 98%) e ácido 4-formilfenilborônico (Combi-Blocks, 98%).

O acompanhamento da reação foi realizado através de cromatografia em camada fina (c.c.f.), empregando uma solução de 10% acetona/clorofórmio, em alguns casos a porcentagem de acetona foi aumentada. As análises de c.c.f. foram realizadas em folhas de alumínio recobertas com gel de sílica (cromatofolhas F254), da Silicycle Ultrapure Silica Gels. Para revelar as placas, foram utilizados os seguintes métodos: exposição da cromatofolha à luz ultravioleta (254 nm), exposição aos vapores de iodo e exposição a uma solução alcoólica acidificada de 2,4-dinitrofenilhidrazina.

6.2. Técnicas empregadas

6.2.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um dos dois espectrofotômetros disponíveis no laboratório Multiusuário de Espectroscopia (LAME) da UFF. O espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier, modelo Varian FT-IR 660 e o espectrofotômetro de infravermelho da Thermo Scientific™ modelo Nicolet™ iS50 FT-IR. Desta forma, é possível obter espectros de infravermelho *via* transmitância ou reflectância total atenuada (ATR) na faixa 400-4000 cm^{-1} , através da leitura direta de amostras sólidas, sem a necessidade de pastilhas de KBr.

6.2.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em aparelho Varian VNMRS 500 MHz e 300 MHz. As amostras foram dissolvidas em solventes deuterados indicados em cada espectro. No caso das análises em CDCl_3 , o tetrametilsilano foi empregado como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ ppm) foram apresentados em partes por milhão. As áreas dos sinais foram obtidas por integração automática no programa MestReNova.

6.2.3. Difração de Raios-X

Os dados de raios-X foram obtidos em um difratômetro para análise de monocristais, modelo Bruker D8Venture com detector CMOS PHOTON100, utilizando radiação MoK α ($\lambda=0,7169\text{\AA}$). As estruturas descritas nesse trabalho foram resolvidas por método direto, e refinadas por mínimos dos quadrados, utilizando o software ShelX. As análises foram realizadas no laboratório Multiusuário de difração de Raio X do Departamento de Física da Universidade Federal Fluminense.

6.3. Procedimento geral para obtenção de benzeno-vinilnitrilas (tirfostinas) através da reação de Knoevenagel com aldeídos comerciais

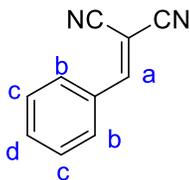
6.3.1. Utilizando a malononitrila como metileno ativo

Em um balão de 50 mL com agitador magnético adicionaram-se 6 mmols do aldeído (**63c-h**). Em seguida, adicionaram-se 6 mmols da malononitrila **62a** e 30 mL de água destilada. Acoplou-se um condensador de refluxo ao balão e a mistura foi mantida sob refluxo.

Após o término da reação, a mistura foi deixada em repouso até a temperatura ambiente e, em seguida, realizou-se uma filtração sob vácuo, lavando-se o precipitado com água gelada.

Os produtos foram caracterizados por ^1H RMN, IR, UV e os pontos de fusão capilar foram medidos.

2-Benzildemalononitrila



64a

O produto **64a** foi obtido com a metodologia 6.3.1. em 4 horas com um rendimento de 85%. Este produto apresenta-se como um sólido de coloração branca e ponto de fusão de 82-84°C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, δ ppm, CDCl_3): 7,92-7,90 (2 H, *d*, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,78 (1 H, *s*, C=C(Ph)H); 7,65-7,62 (1 H, *t*, $J = 7,5$ Hz, Ar-H); 7,56-7,53 (2 H, *t*, $J = 7,8$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (126 MHz, δ ppm, CDCl_3): 160,02; 134,65; 130,95; 130,74; 129,64; 113,74; 112,59; 82,80.

IV (cm^{-1}): 3037 (ν de sp^2 C-H); 2223 (ν de $\text{C}\equiv\text{N}$); 1591 (ν de C=C vinílico); 1568 (ν de C=C de anel Ar); 755; 679 (δ_{oop} de C-H, padrão de monossustituição).

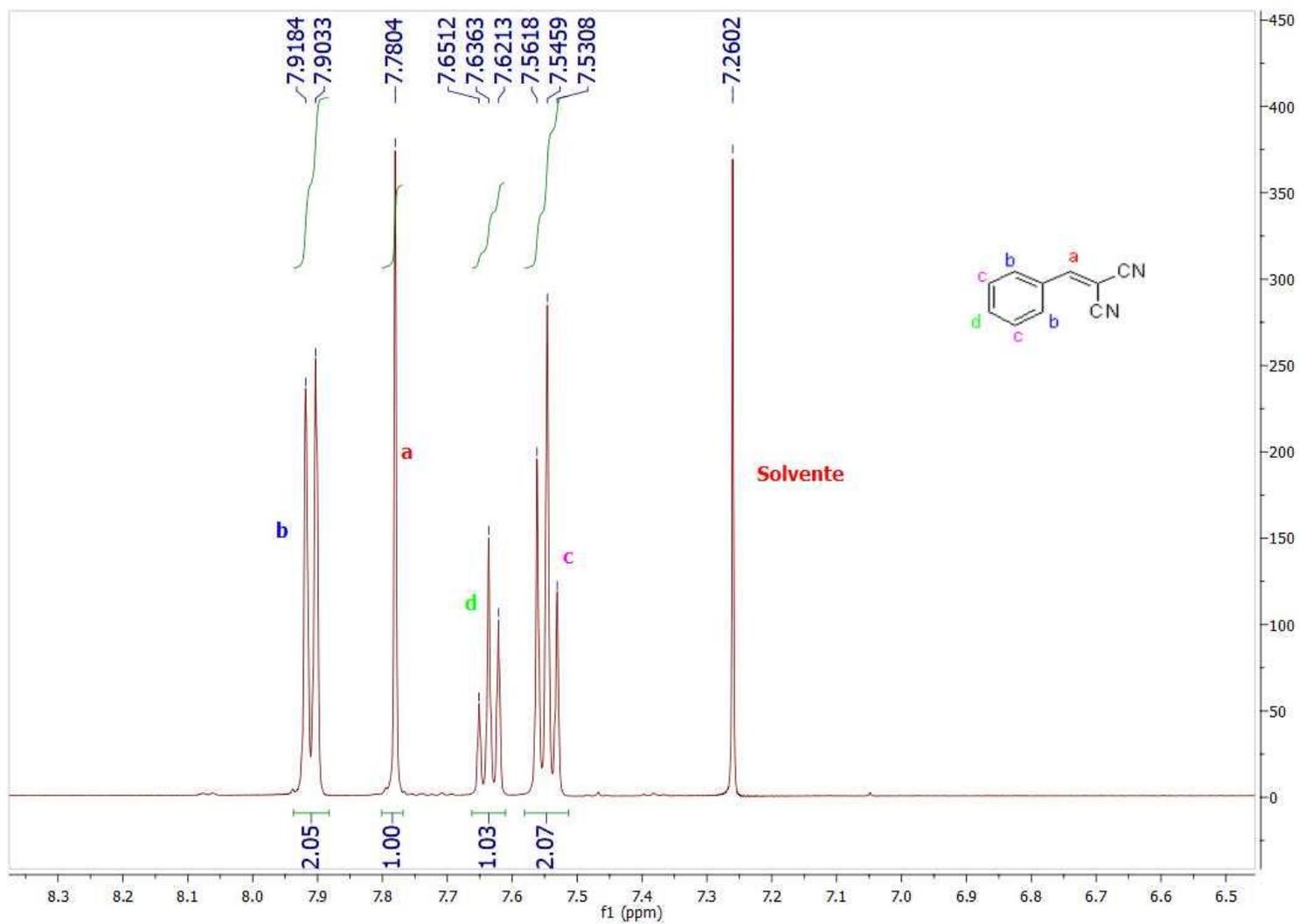


Figura 69 - Espectro de ^1H -RMN do **64a** usando CDCl_3 como solvente

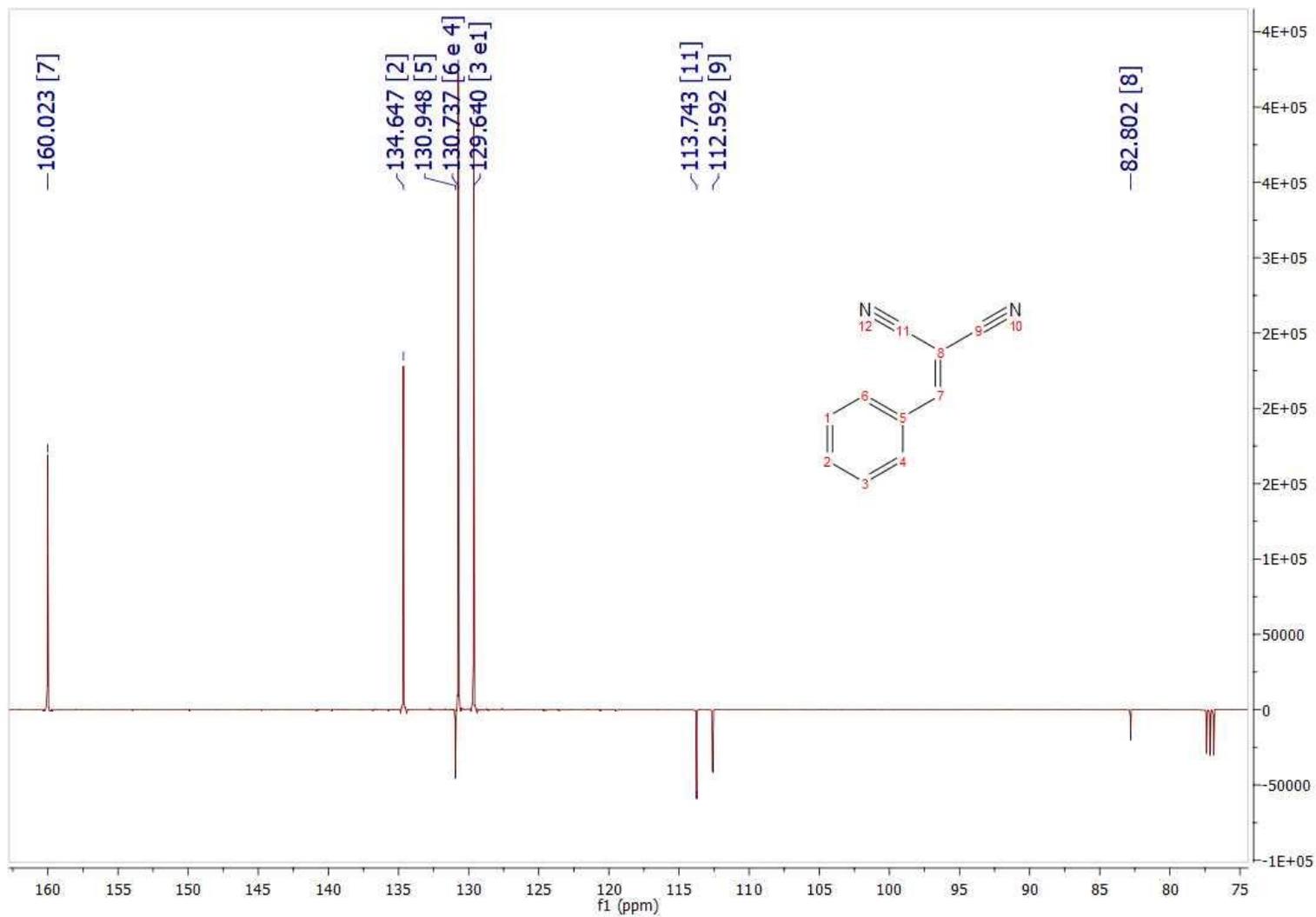


Figura 70 - Espectro de APT do **64a** usando CDCl_3 como solvente (CH e CH_3 para cima)

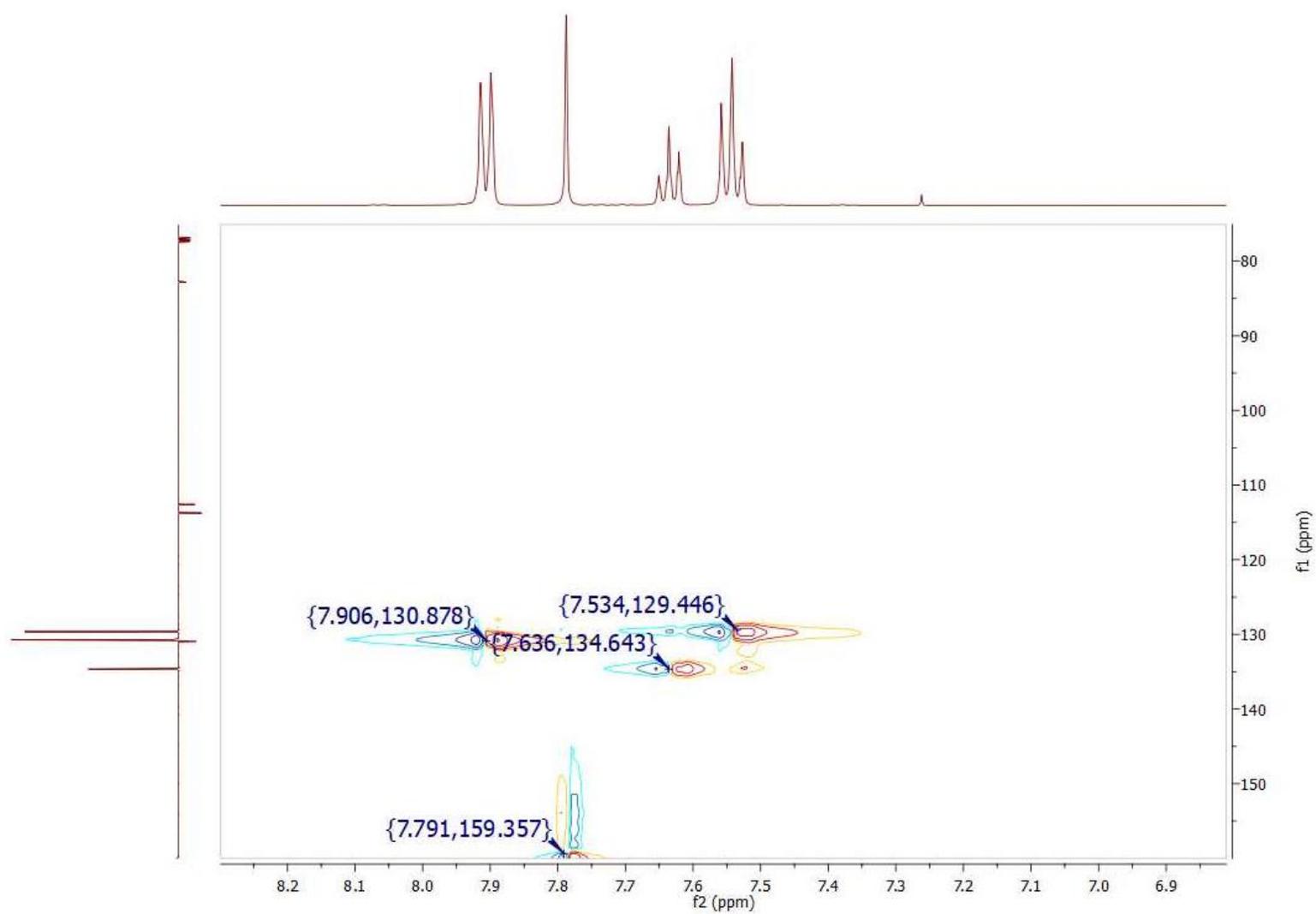


Figura 71 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **64a** usando CDCl_3 como solvente

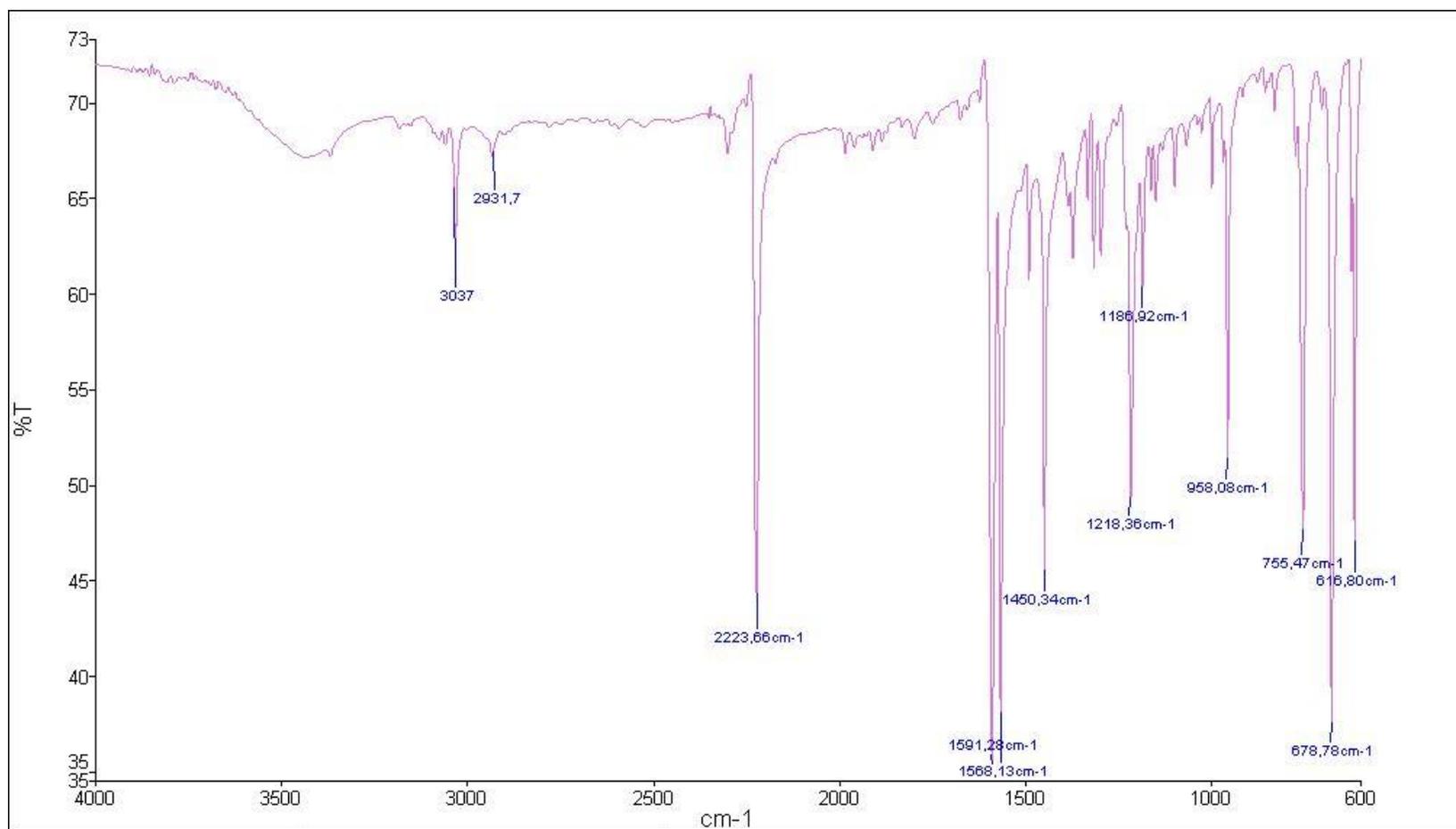


Figura 72 - Espectro de IV do produto 64a

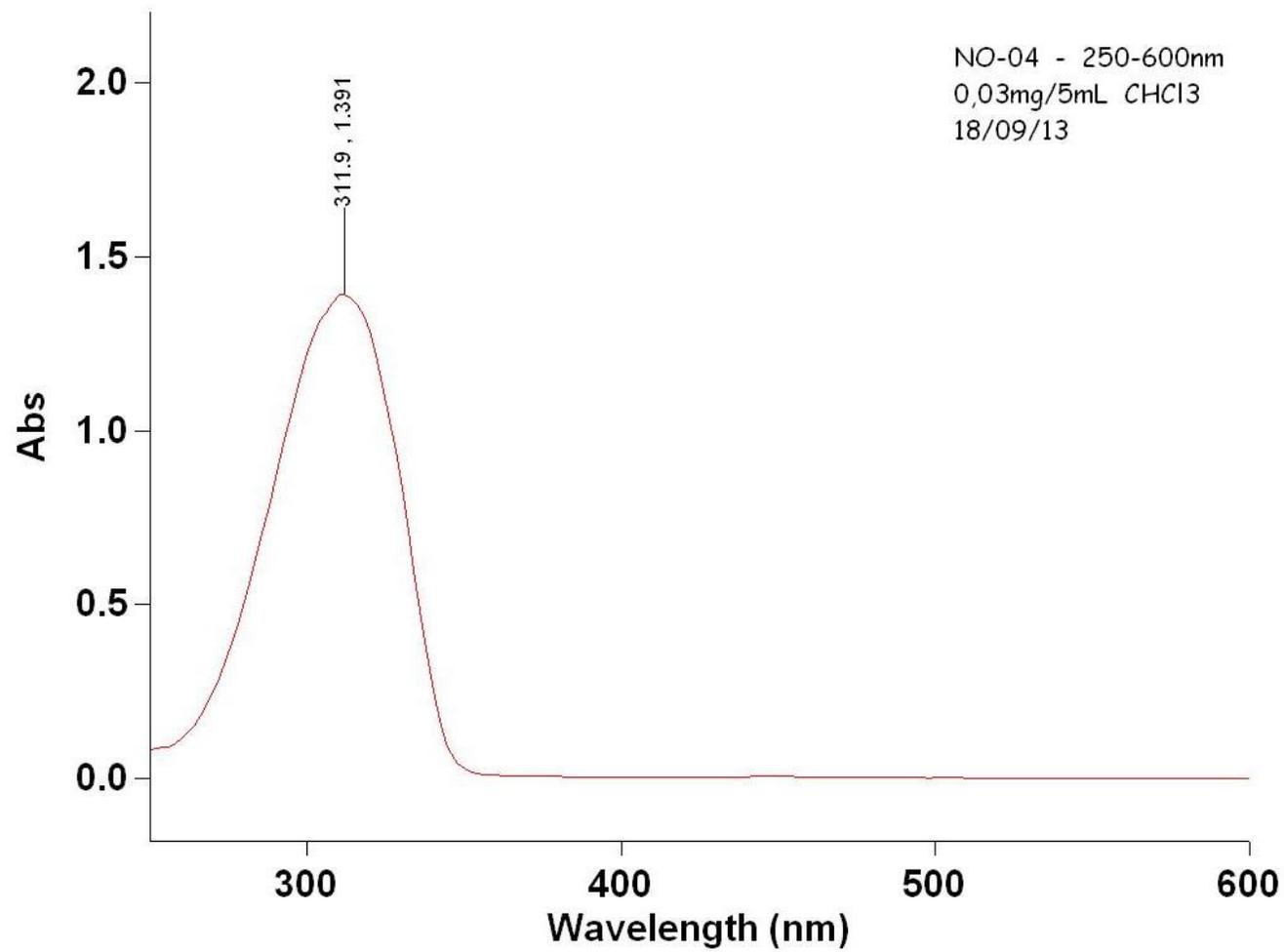
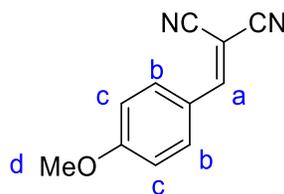


Figura 73 - Espectro de UV do 64a

2-(4-Metoxibenzilideno)malononitrila



64b

O produto **64b** foi obtido com a metodologia 6.3.1. em 4 horas com um rendimento de 90%. Este produto apresenta-se como um sólido de coloração amarela e ponto de fusão de 116-118°C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, δ ppm, CDCl_3): 7,921-7,903 (2 H, *d*, $J = 8,9$ Hz, Ar-H); 7,652 (1 H, *s*, C=C(Ph)H); 7,024-7,006 (2 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, Ar-H); 3,916 (3 H, *s*, CH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm, CDCl_3): 164,84; 158,91; 133,46; 124,02; 115,15; 114,45; 113,38; 78,46; 55,82.

IV (cm^{-1}): 3025 (ν de sp^2 C-H); 2854 (ν de sp^3 C-H); 2224 (ν de $\text{C}\equiv\text{N}$); 1558 (ν de C=C vinílico); 1605; 1571; 1513 (ν de C=C de Ar); 1279 (ν_{ass} de C-O); 1022 (ν_{s} de C-O); 834 (δ_{oop} de C-H, padrão de substituição *para*).

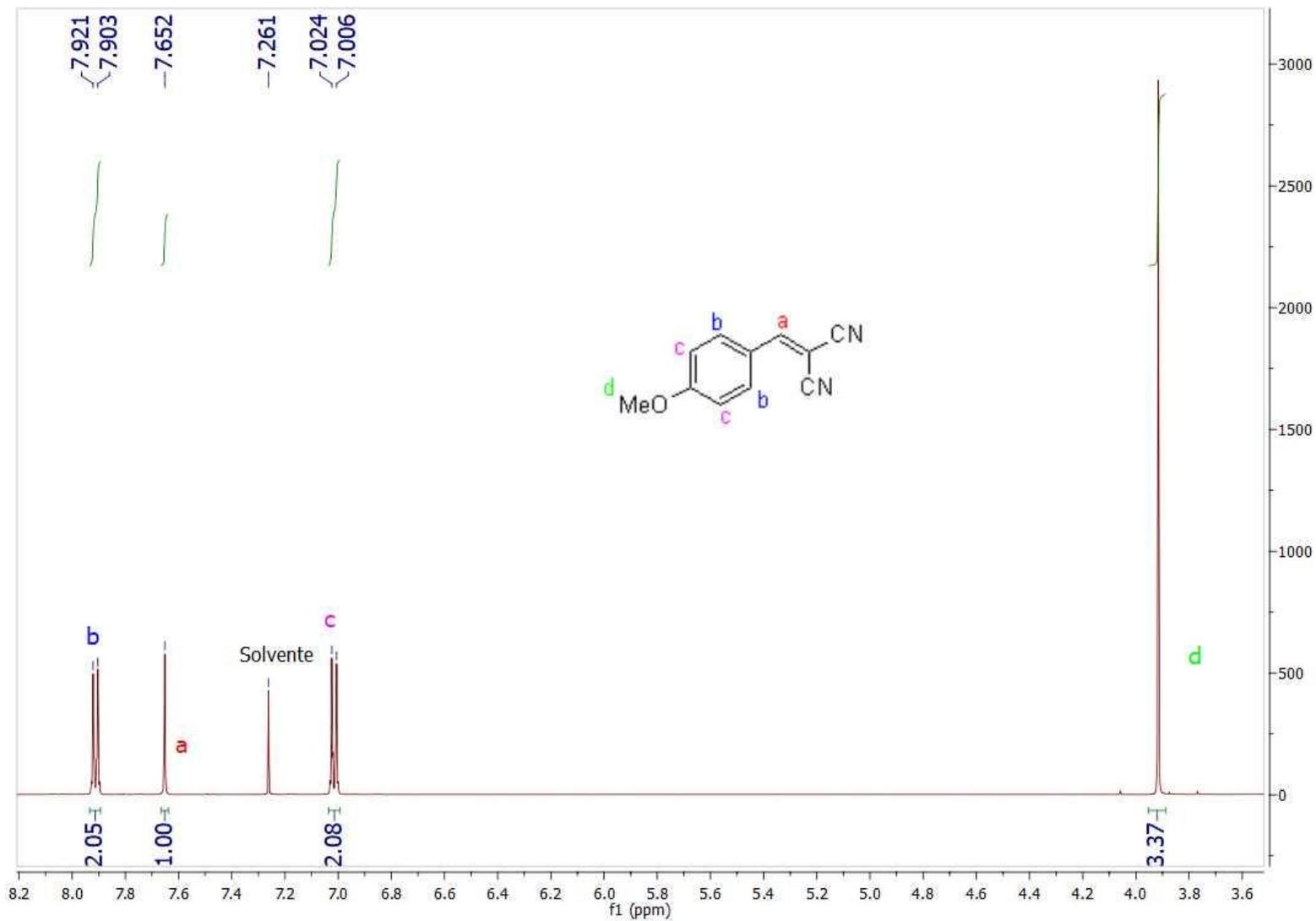


Figura 74 - Espectro de ¹H-RMN do **64b** usando CDCl₃ como solvente

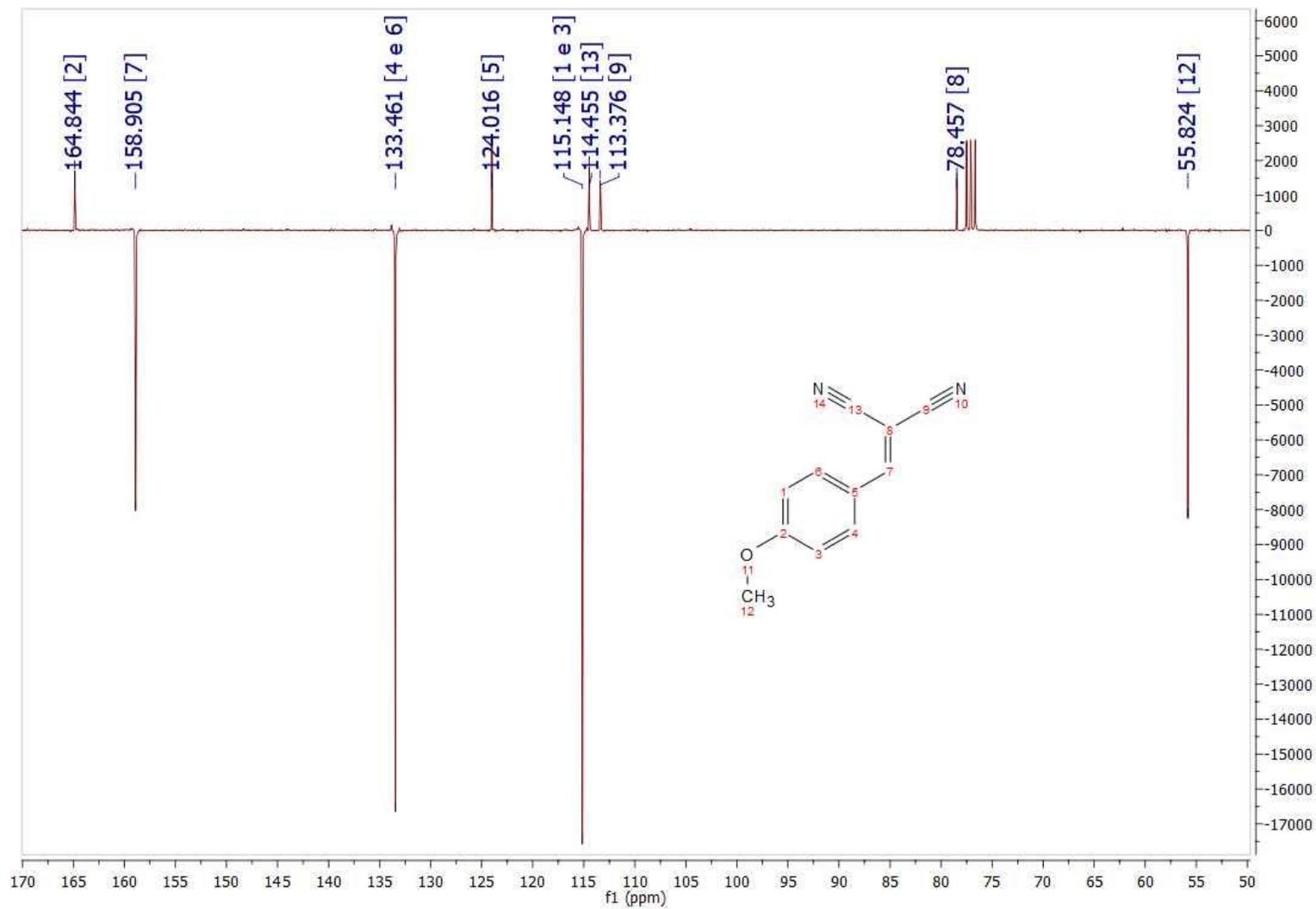


Figura 75 - Espectro de APT do **64b** usando CDCl₃ como solvente (CH e CH₃ para baixo)

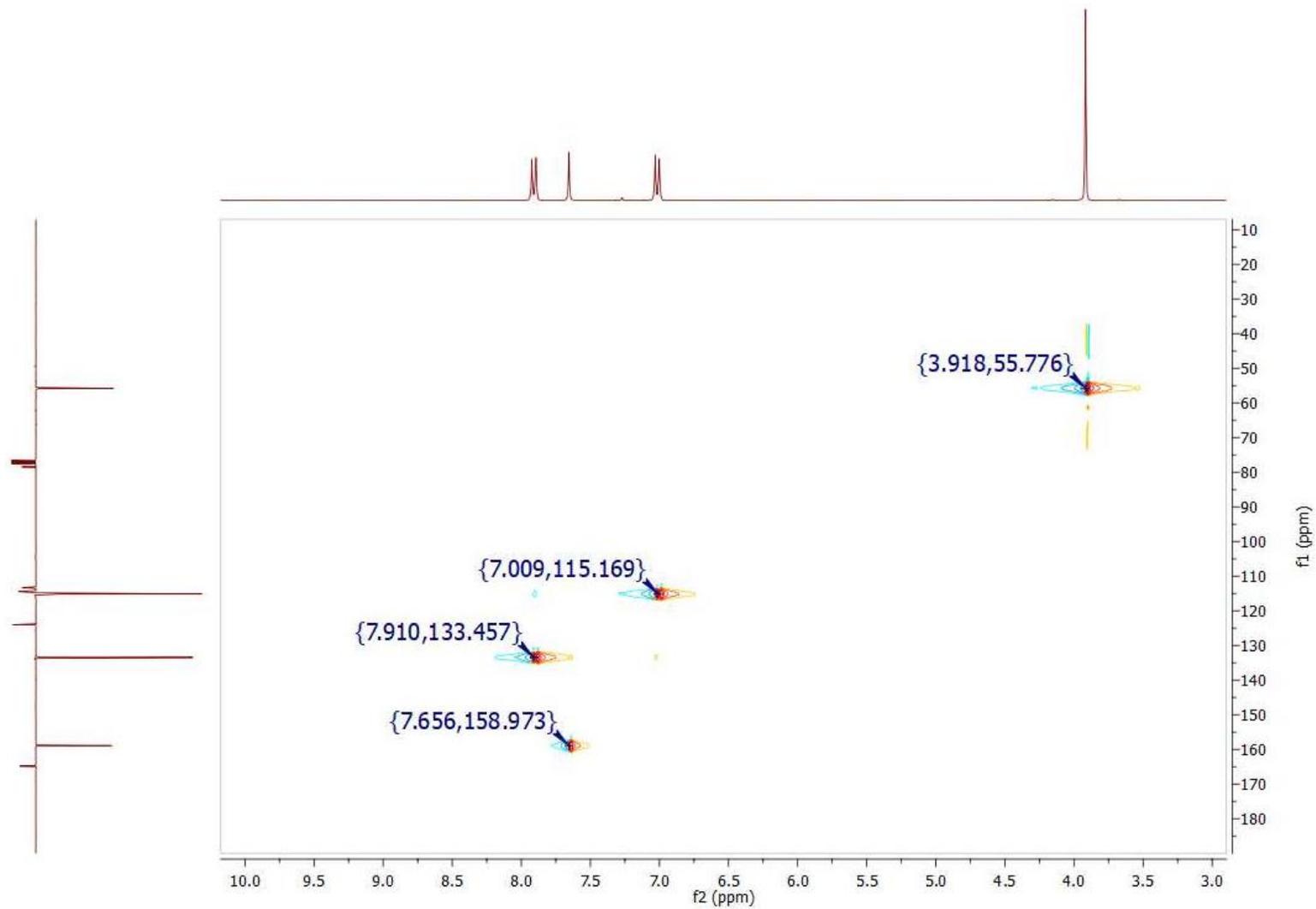


Figura 76 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **64b** usando CDCl_3 como solvente

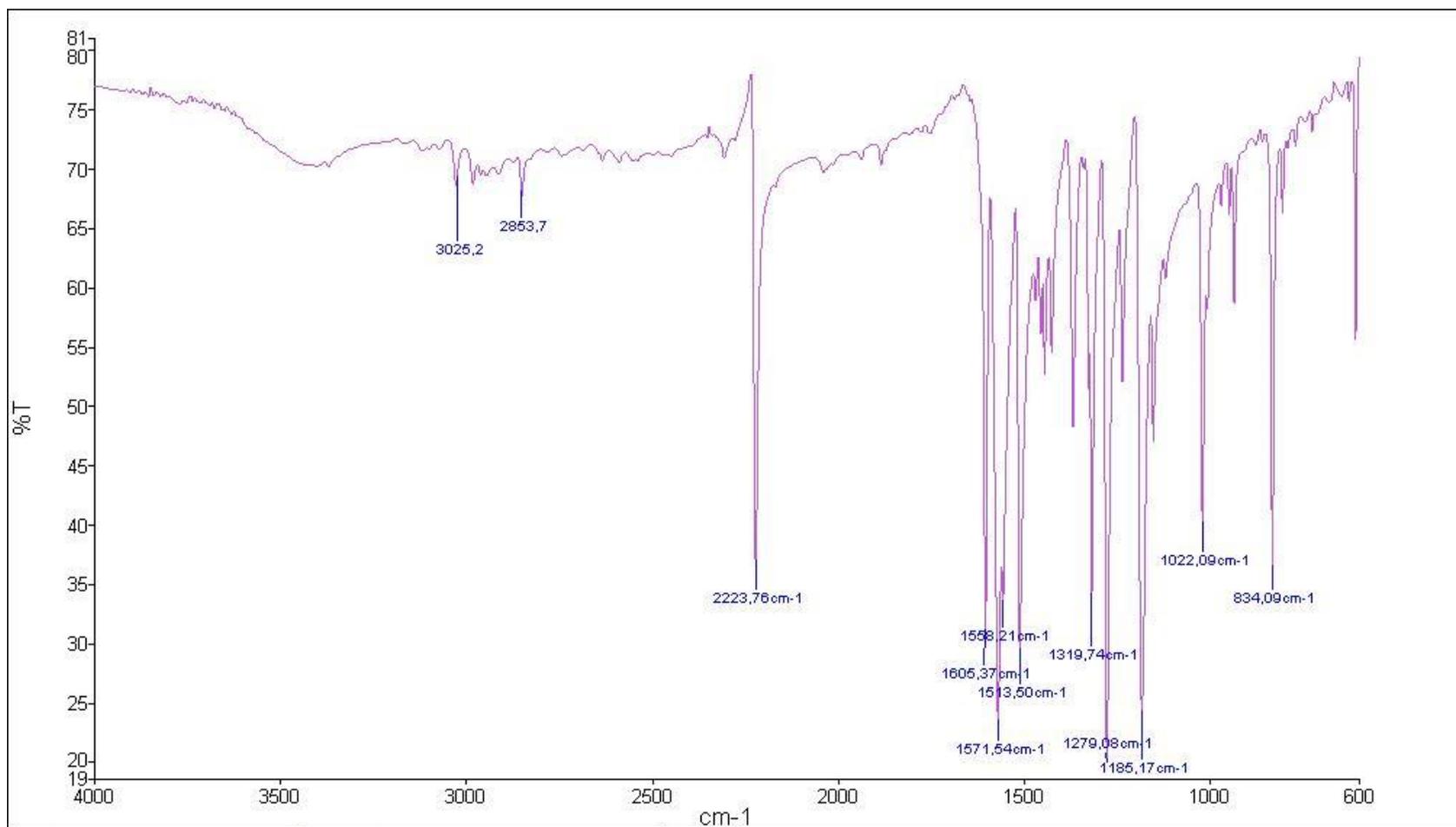


Figura 77 - Espectro de IV do produto 64f

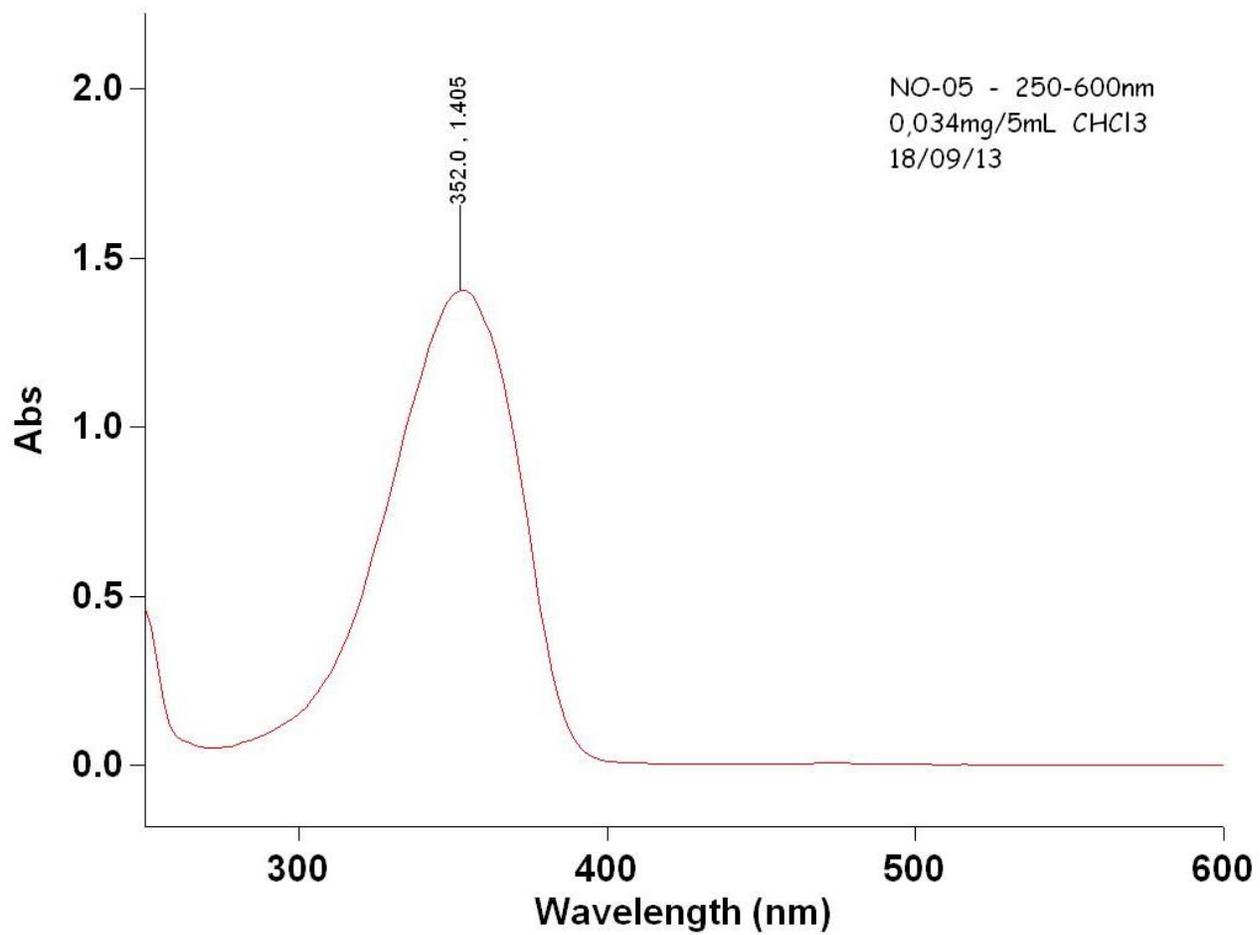
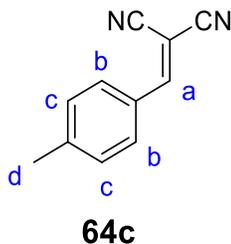


Figura 78 - Espectro de UV do **64b**

2-(4-Metilbenzilideno)malononitrila



O produto **64c** foi obtido com a metodologia 6.3.1. em 2 horas com um rendimento de 98%. Este produto apresenta-se como um sólido de coloração branca e ponto de fusão de 136-137°C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, δ ppm CDCl_3): 7,83-7,80 (2 H, *d*, $J = 9$ Hz, Ar-H); 7,72 (1 H, *s*, C=C(Ph)H); 7,35-7,32 (2 H, *d*, $J = 9$ Hz, Ar-H); 2,46 (3 H, *s*, CH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm, CDCl_3): 159,78; 146,39; 130,91; 130,38; 128,47; 114,02; 112,87; 81,17; 22,01.

IV (cm^{-1}): 3036 (ν de sp^2 C-H); 2222 (ν de $\text{C}\equiv\text{N}$); 1586 (ν de C=C vinílico); 1605;1554 (ν de C=C de anel Ar); 1375 (δ de CH_3); 812 (δ_{oop} de C-H, padrão de substituição *para*).

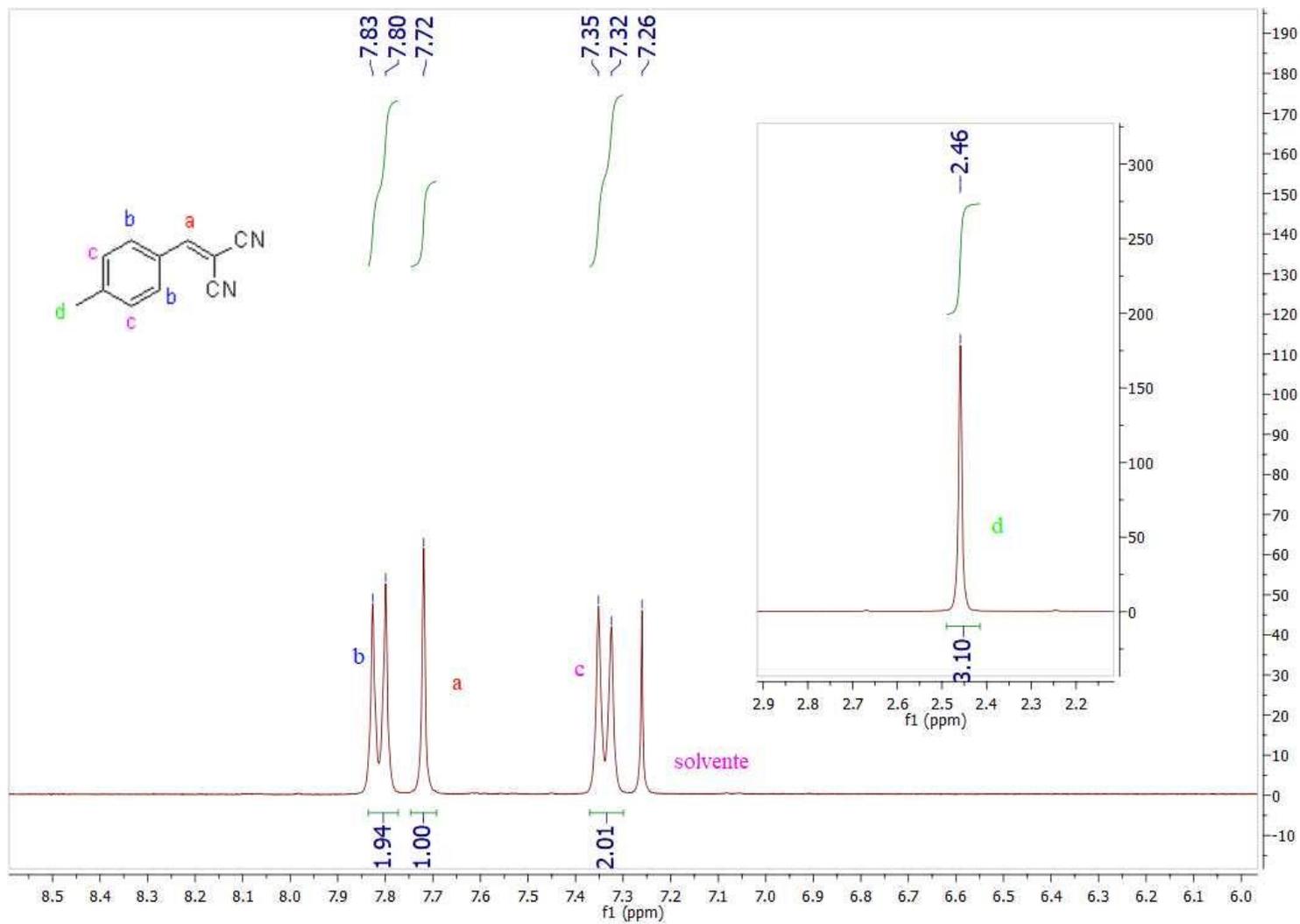


Figura 79 - Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do **64c** usando CDCl_3 como solvente

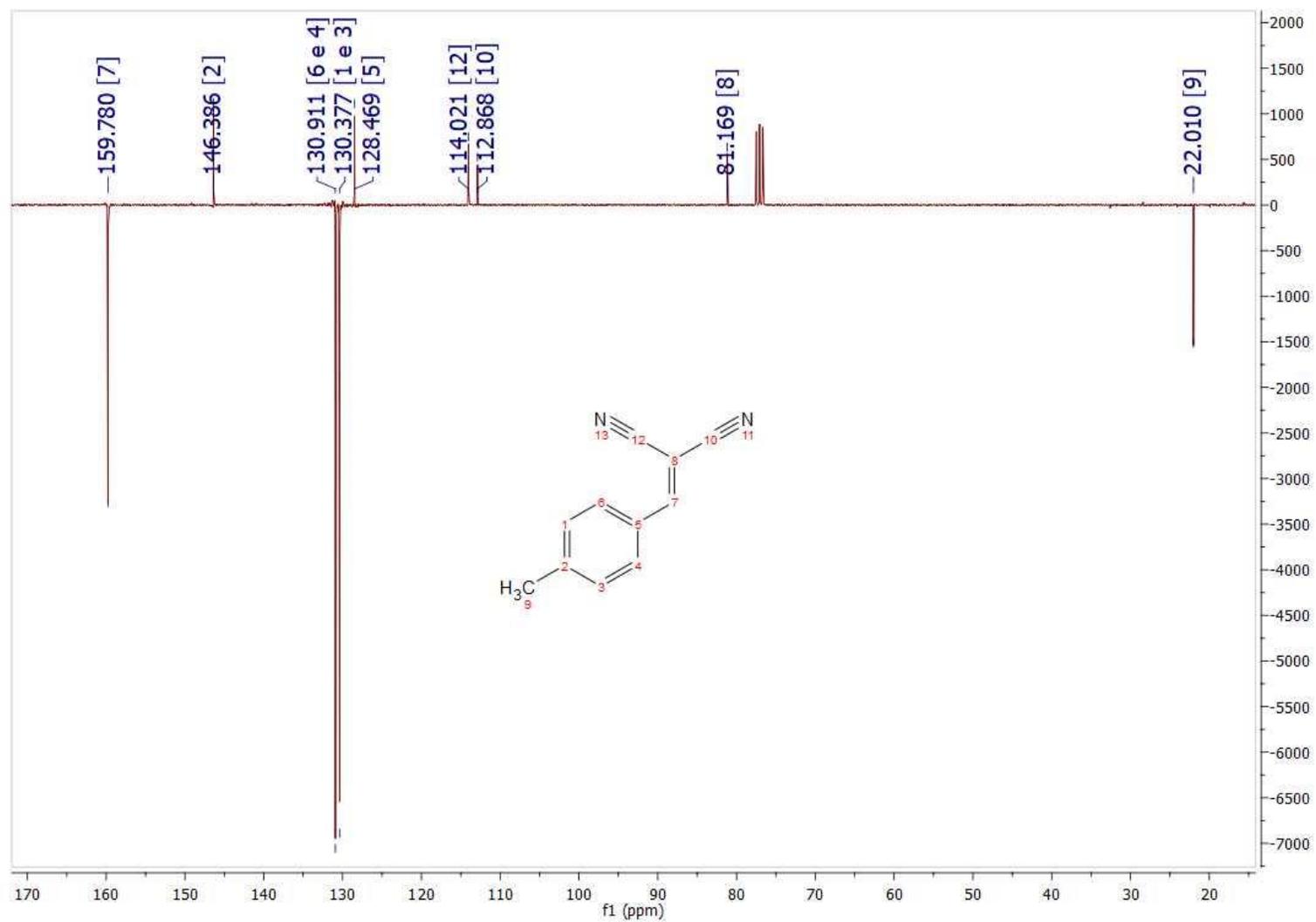


Figura 80 - Espectro de APT do **64c** usando CDCl₃ como solvente (CH e CH₃ para baixo)

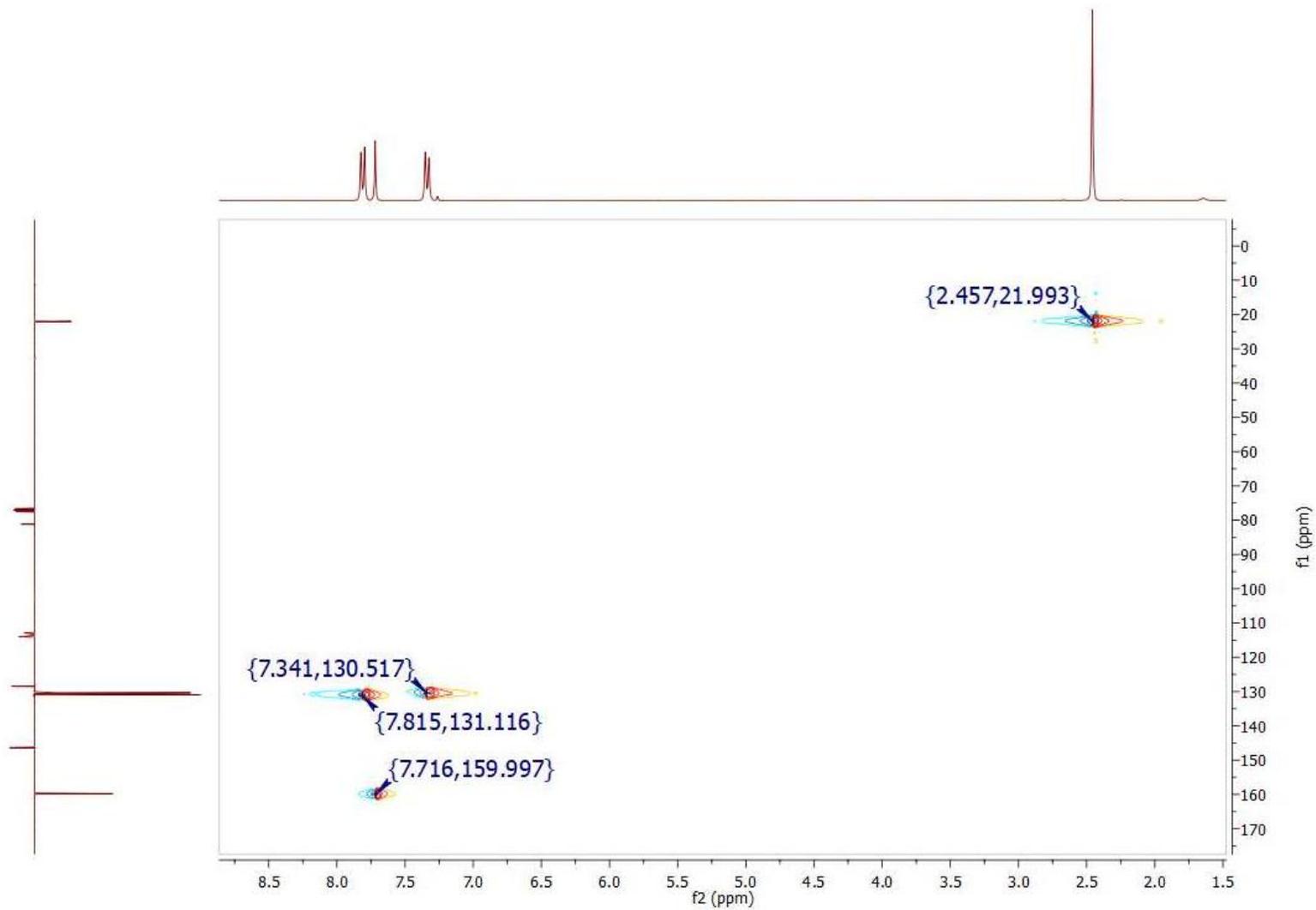


Figura 81 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **64c** usando CDCl_3 como solvente

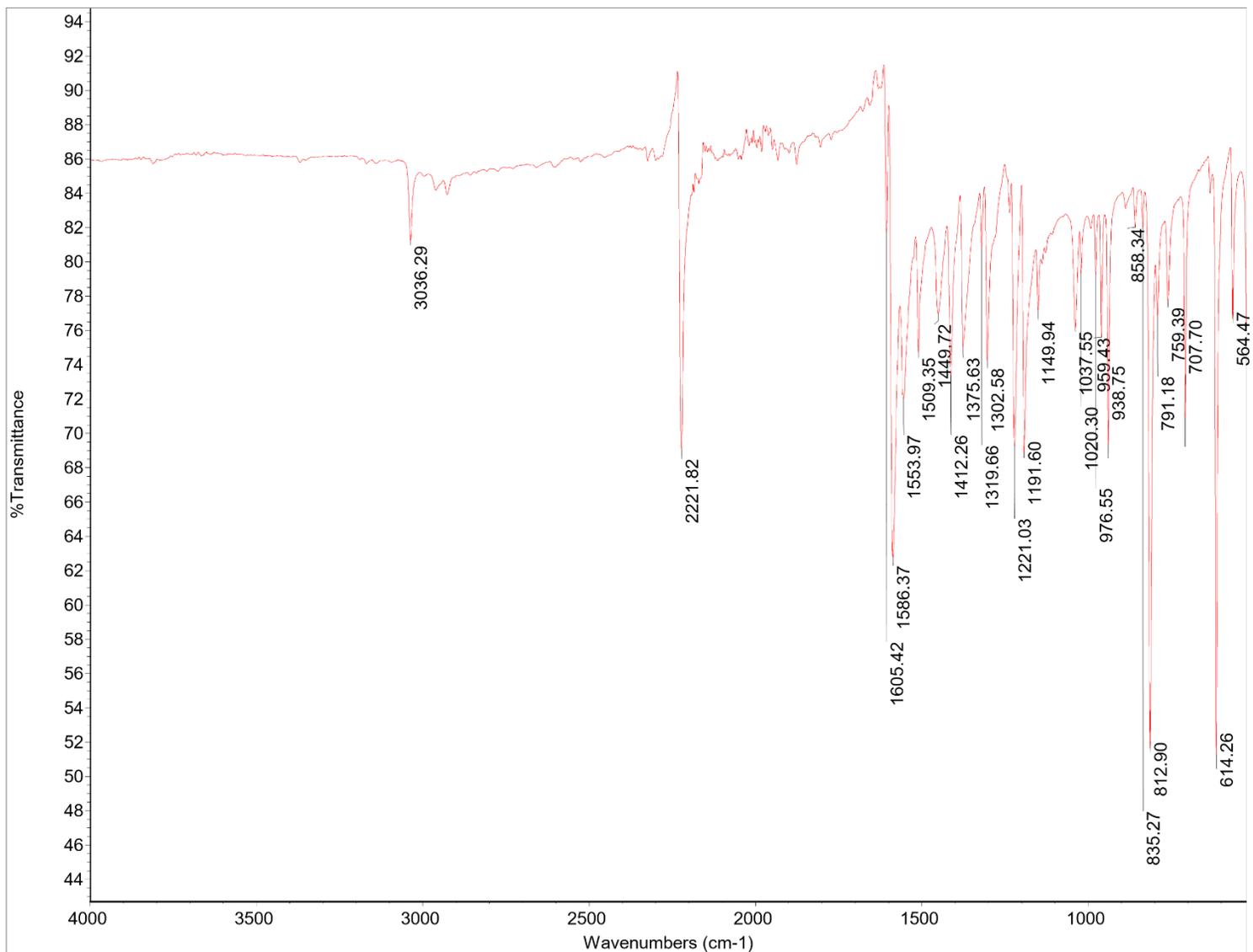


Figura 82 - Espectro de IV do produto 64c

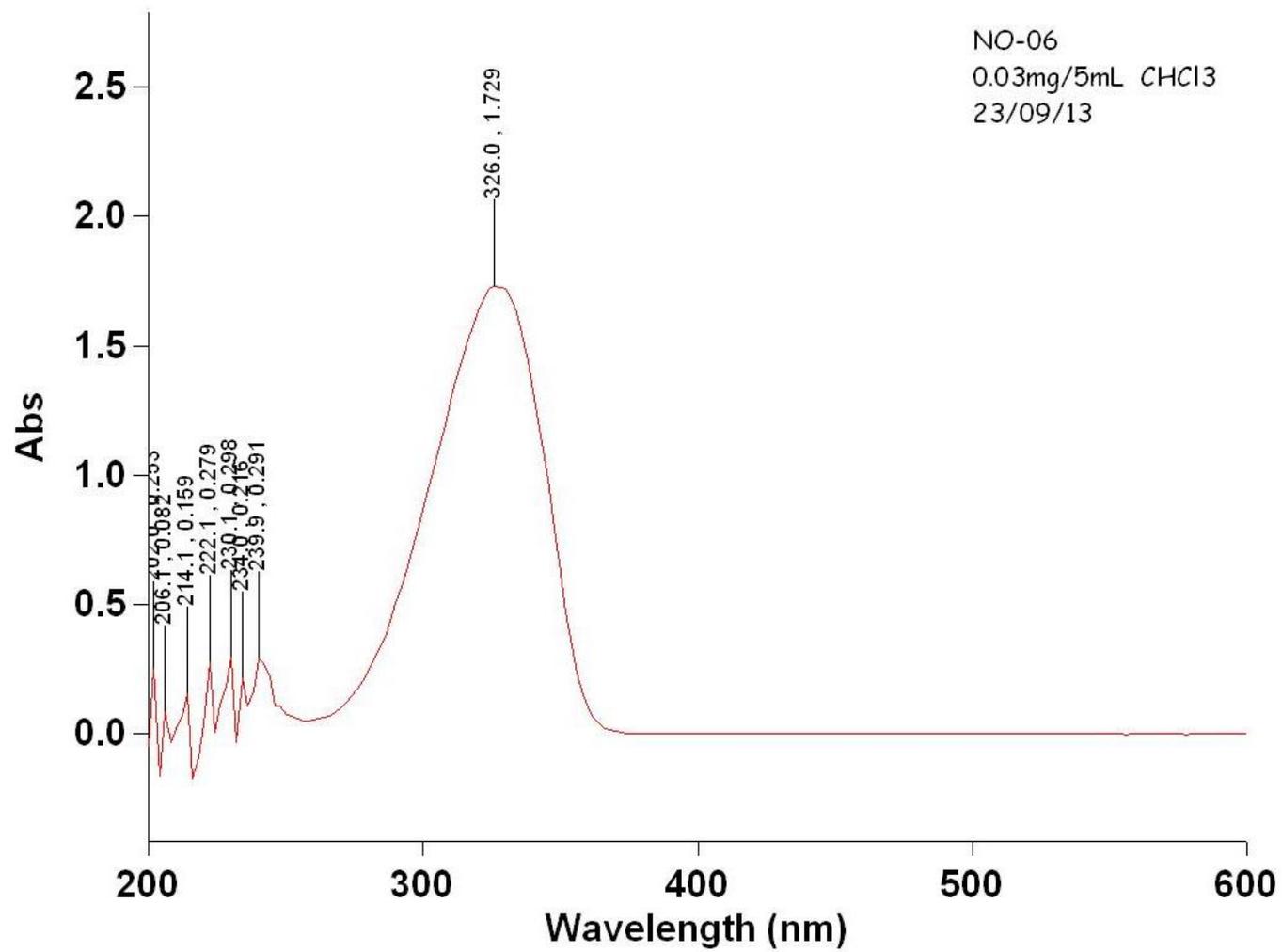
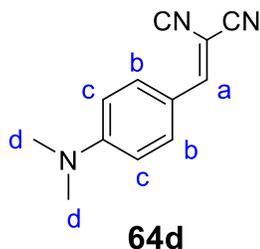


Figura 83 - Espectro de UV do 64c

2-(4-Dimetilaminobenzilideno)malononitrila



O produto **64d** foi obtido com a metodologia 6.3.1. em 2 horas com um rendimento de 93%. Este produto apresenta-se como um sólido de coloração laranja e ponto de fusão de 185-188°C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, δ ppm DMSO): 7,826-7,796 (2 H, *d*, $J = 9,0$ Hz, Ar-H); 7,458 (1 H, *s*, C=C(Ph)H); 6,705-6,674 (1 H, *d*, $J = 9,2$ Hz, Ar-H); 3,141 (6 H, *s*, CH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm, CDCl₃): 158,0; 154,28; 133,80; 119,23; 116,04; 114,97; 111,61; 71,61; 40,09.

IV (cm⁻¹): 3025 (ν de sp² C-H); 2854 (ν de sp³ C-H); 2224 (ν de C≡N); 1558 (ν de C=C vinílico); 1605; 1571; 1513 (ν de C=C de Ar); 1279 (ν_{ass} de C-O); 1022 (ν_{s} de C-O); 834 (δ_{oop} de C-H, padrão de substituição *para*).

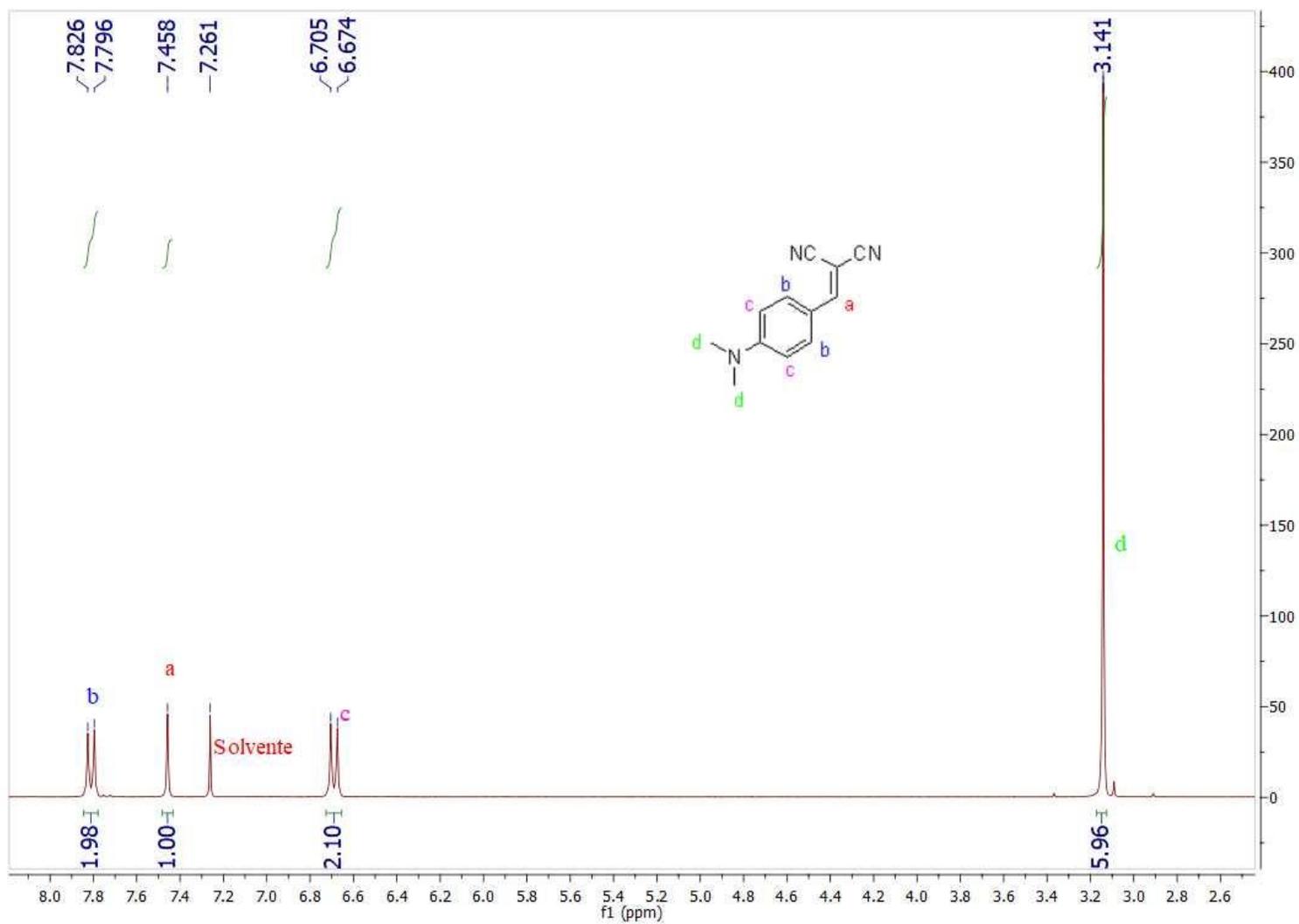


Figura 84 - Espectro de ¹H-RMN do 64d usando CDCl₃ como solvente

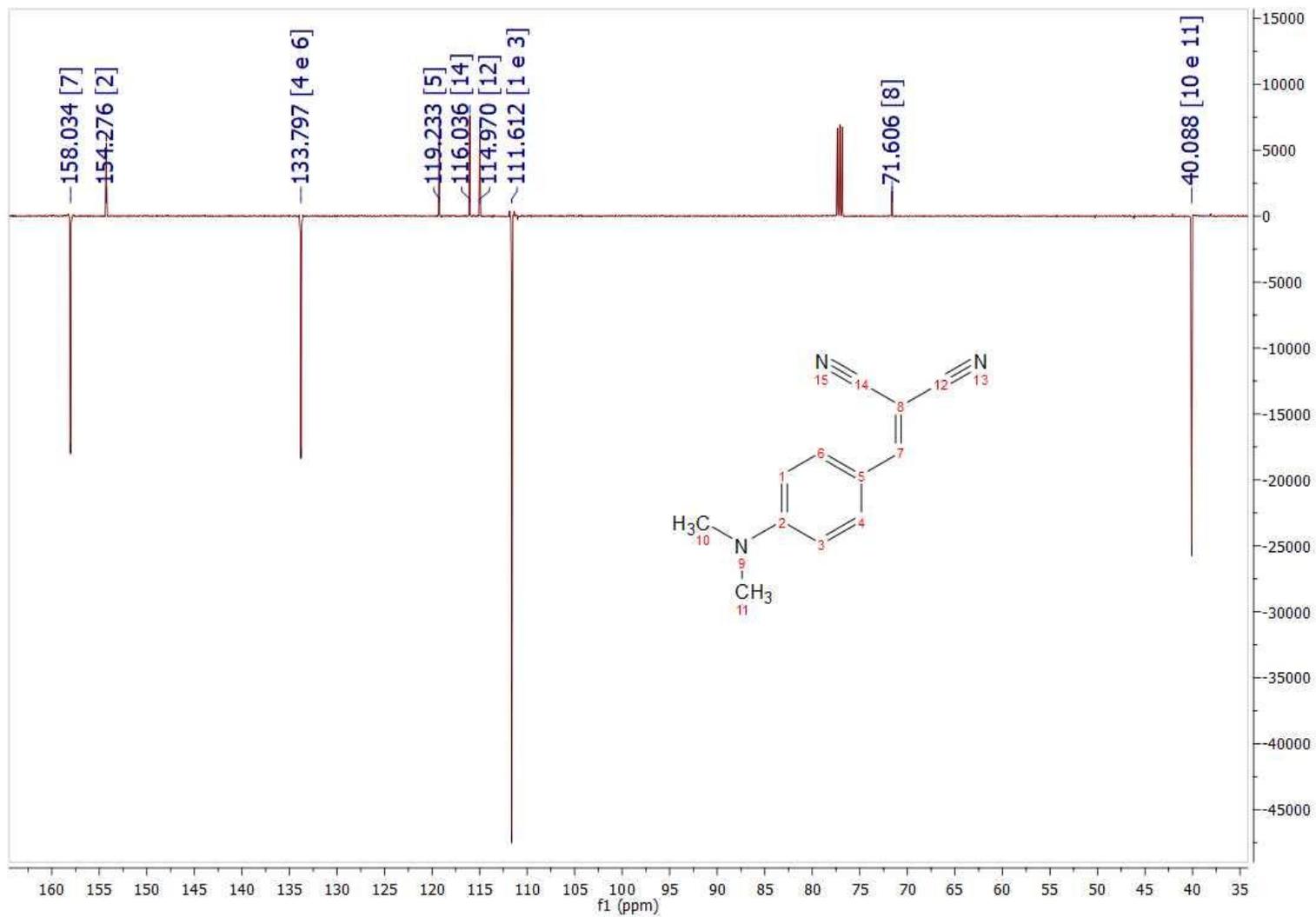


Figura 85 - Espectro de APT do **64d** usando CDCl_3 como solvente (CH e CH_3 para baixo)

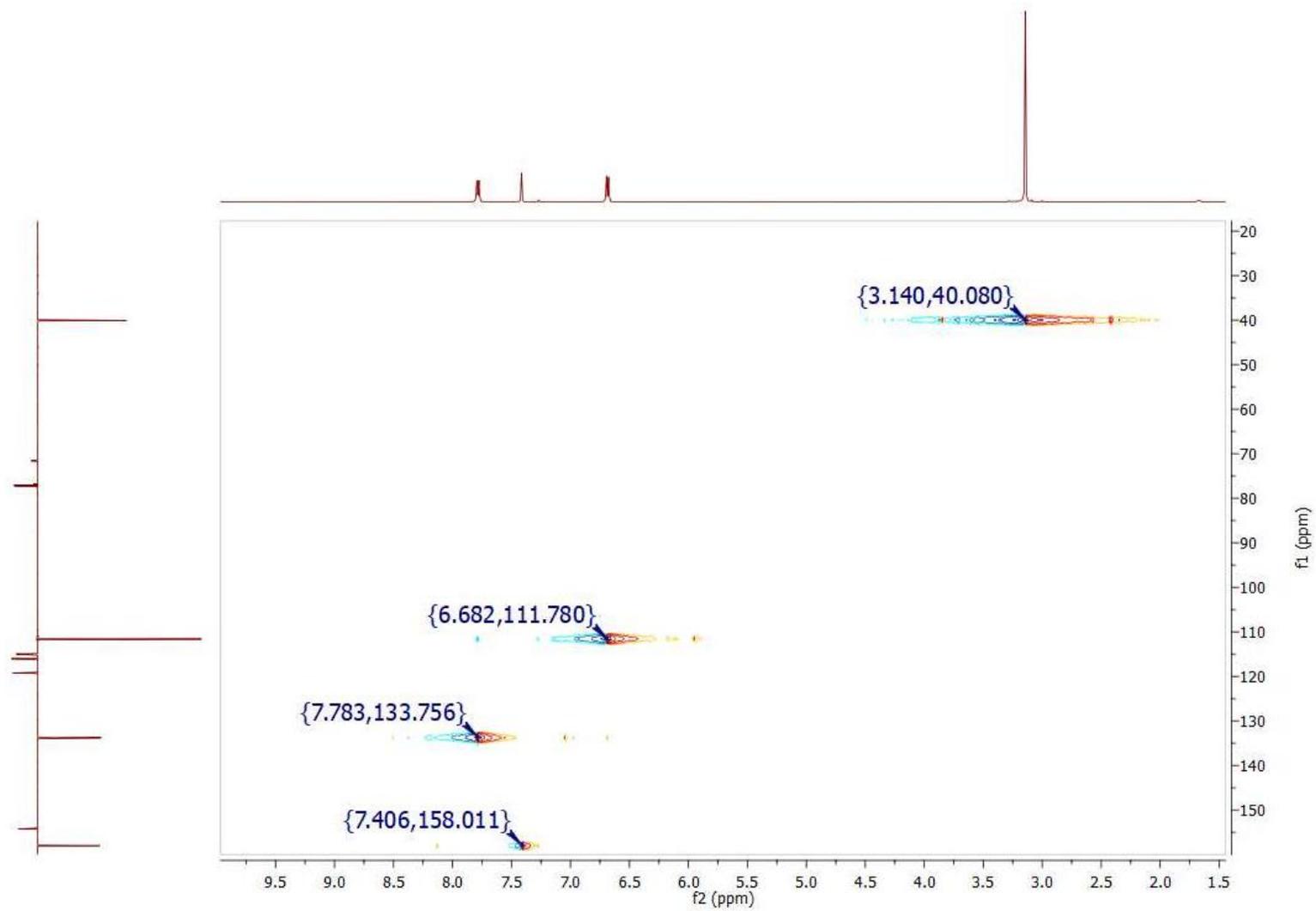


Figura 86 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **64d** usando CDCl_3 como solvente

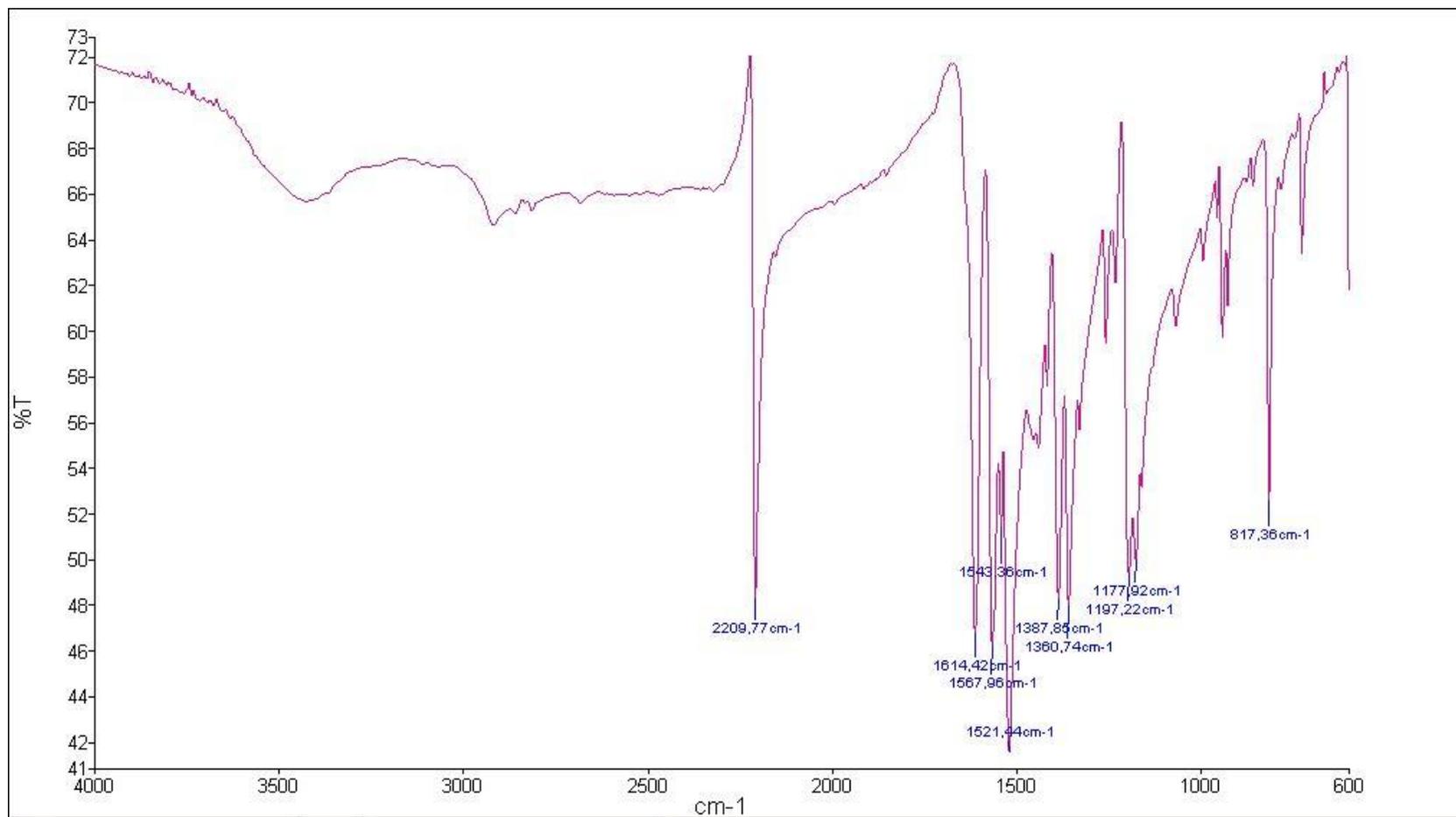


Figura 87 - Espectro de IV do produto 64d

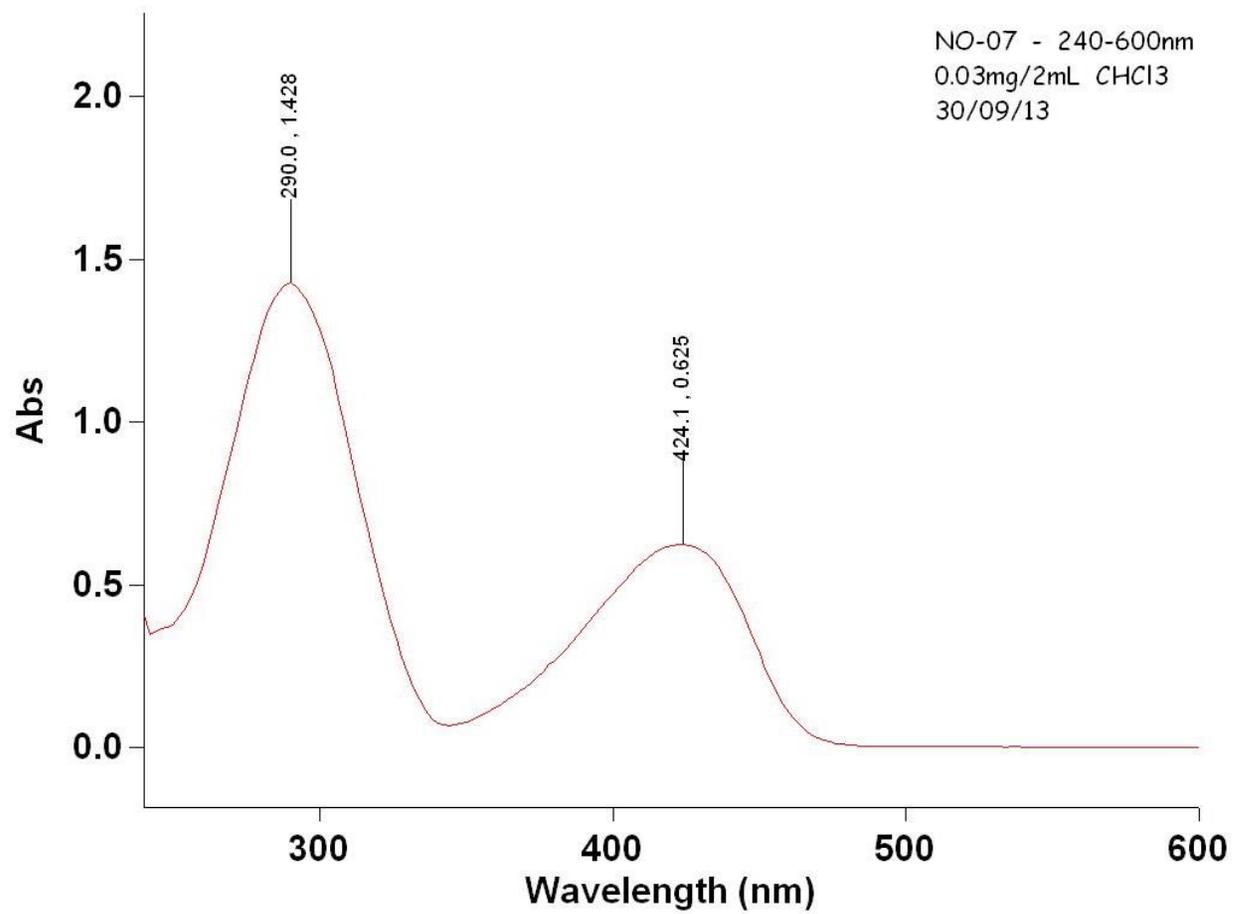
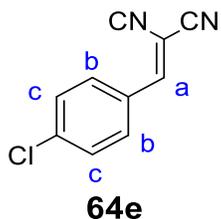


Figura 88 - Espectro de UV do 64d

2-(4-Clorobenzilideno)malononitrila



O produto **64e** foi obtido com a metodologia 6.3.1. em 4 horas com um rendimento de 97%. Este produto apresenta-se como um sólido de coloração branca e ponto de fusão de 167-169°C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, δ ppm CDCl_3): 7,87-7,84 (2 H, *d*, $J = 6$ Hz, Ar-H); 7,73 (1 H, *s*, C=C(Ph)H); 7,54-7,51 (2 H, *d*, $J = 6$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm CDCl_3) 158,31; 141,14; 131,84; 130,07; 129,28; 113,45; 112,34; 83,35.

IV (cm^{-1}): 3033 (ν de sp^2 C-H); 2226 (ν de $\text{C}\equiv\text{N}$); 1581 (ν de C=C vinílico); 1556 (ν de C=C de anel Ar); 1094 (ν de sp^2 C-Cl); 826 (δ_{oop} de C-H, padrão de substituição *para*).

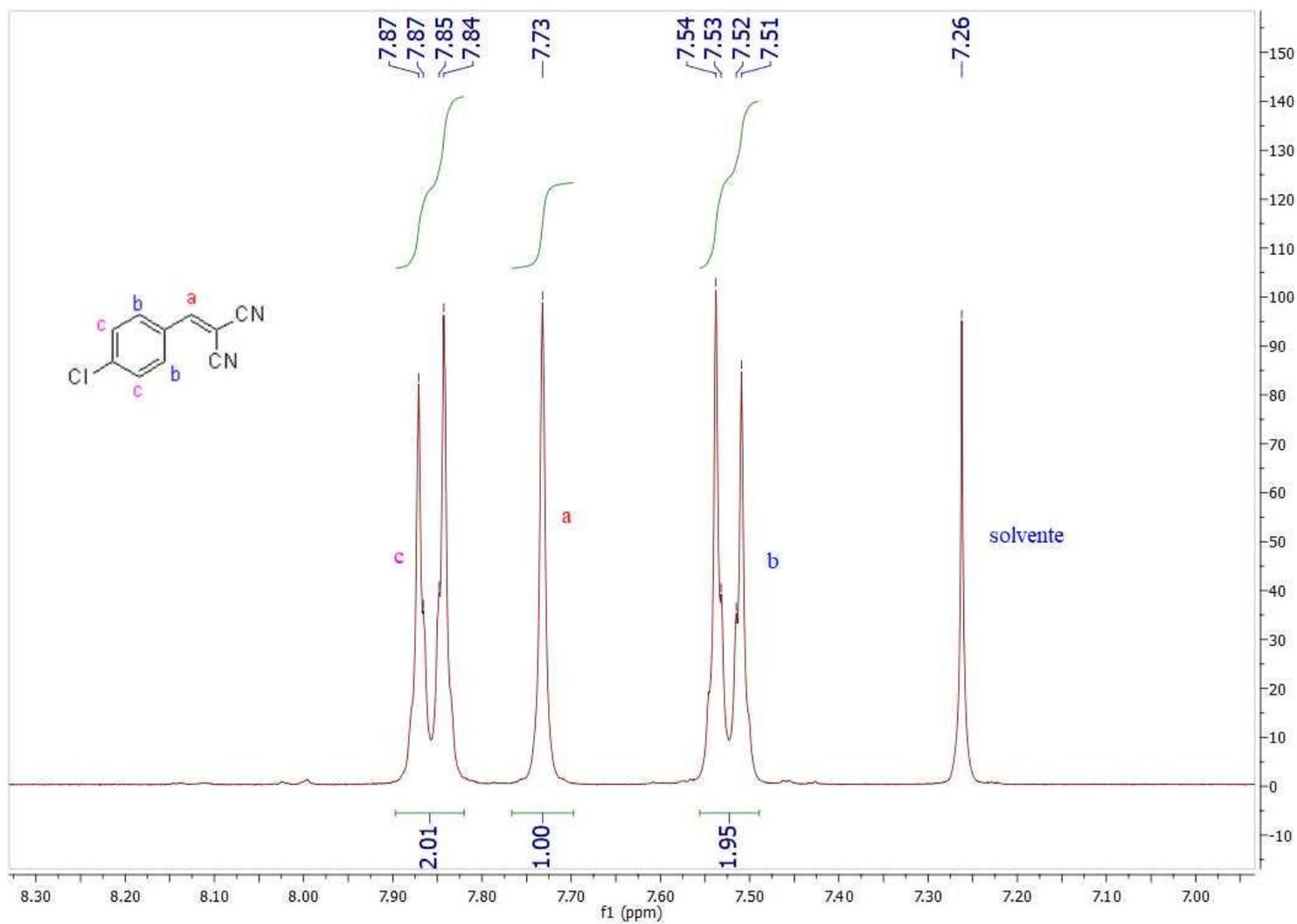


Figura 89 - Espectro de ¹H-RMN do **64e** usando CDCl₃ como solvente

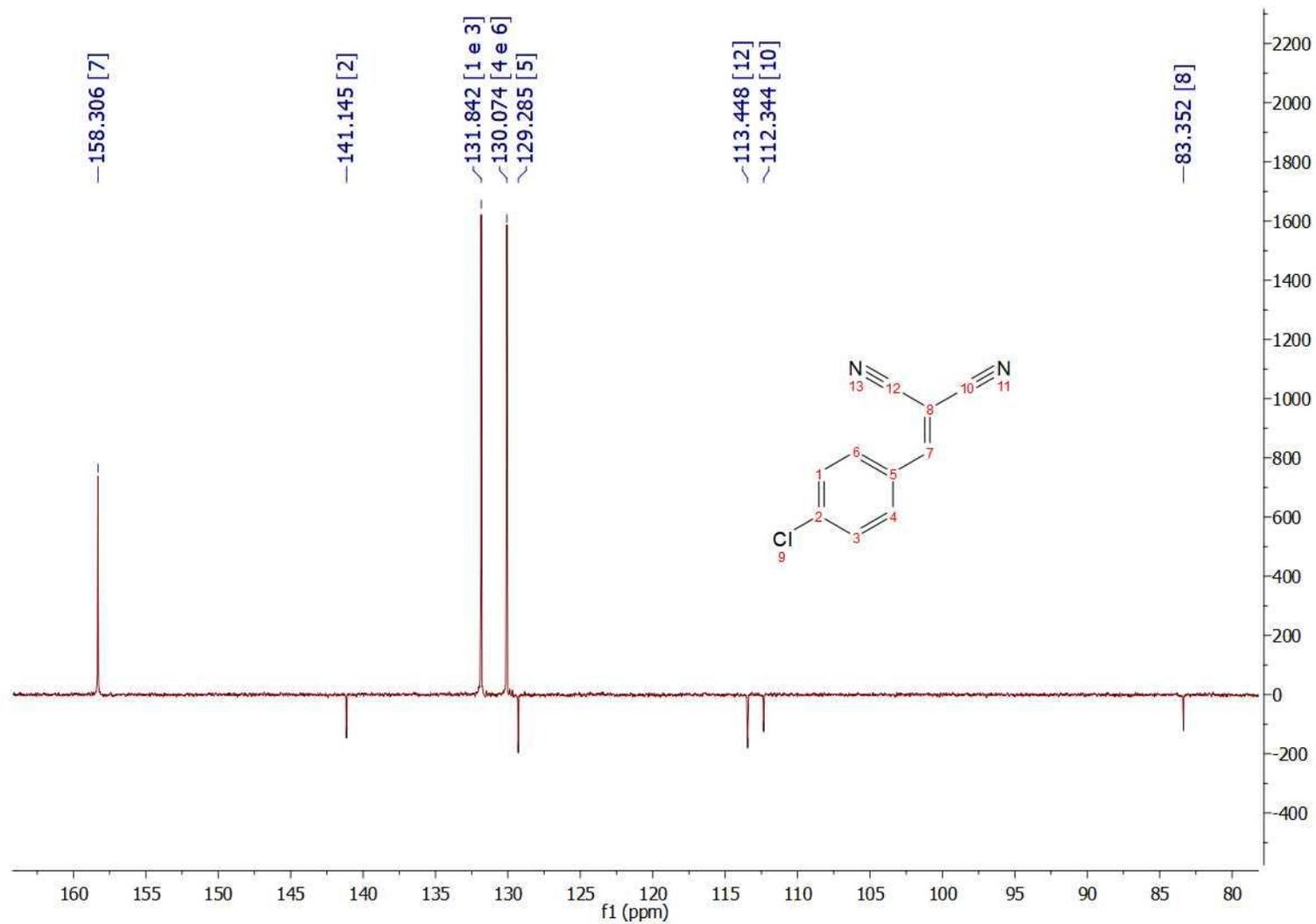


Figura 90 - Espectro de APT do **64e** usando CDCl_3 como solvente (CH e CH_3 para cima)

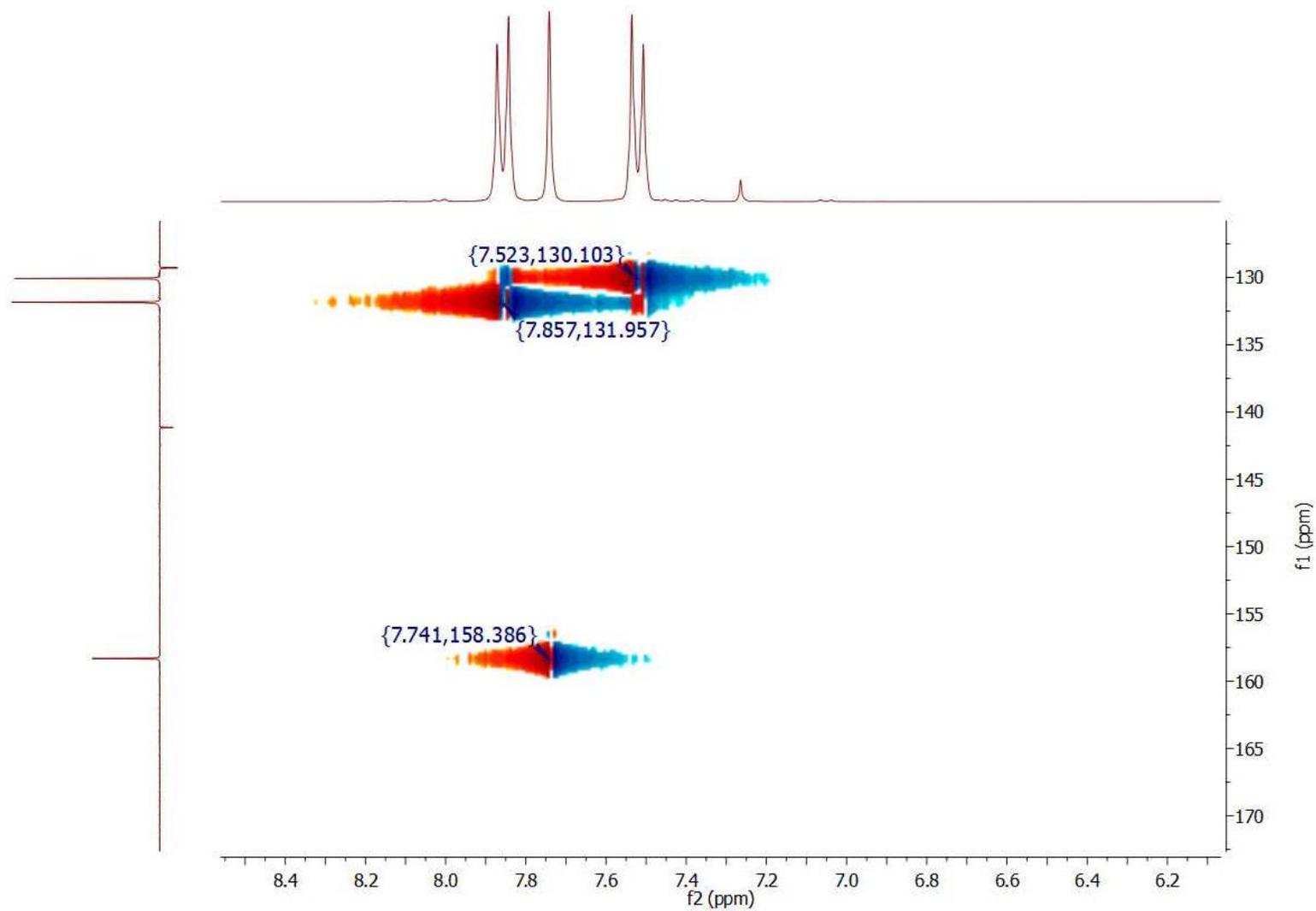


Figura 91 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **64e** usando CDCl_3 como solvente

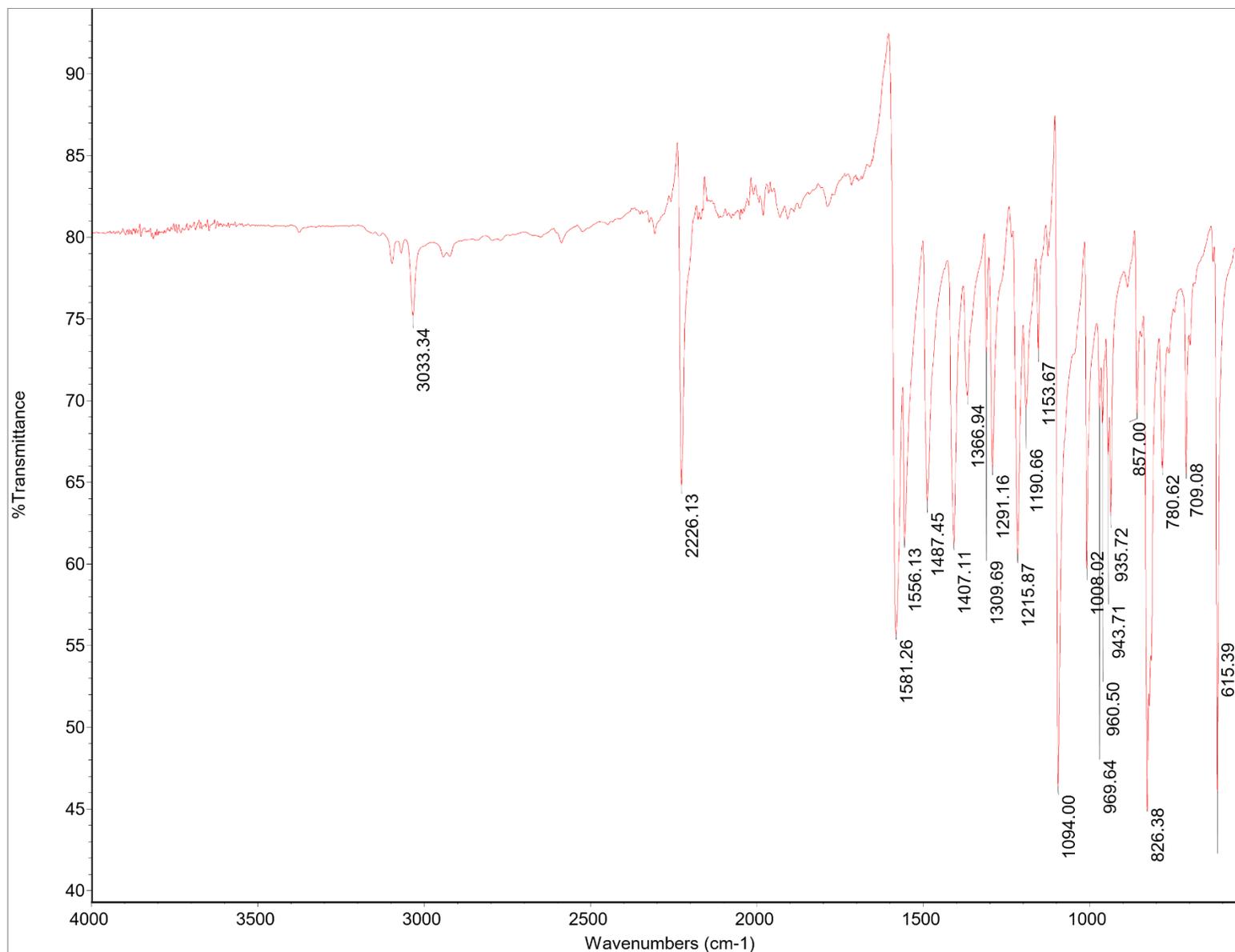


Figura 92 - Espectro de IV do produto 64e

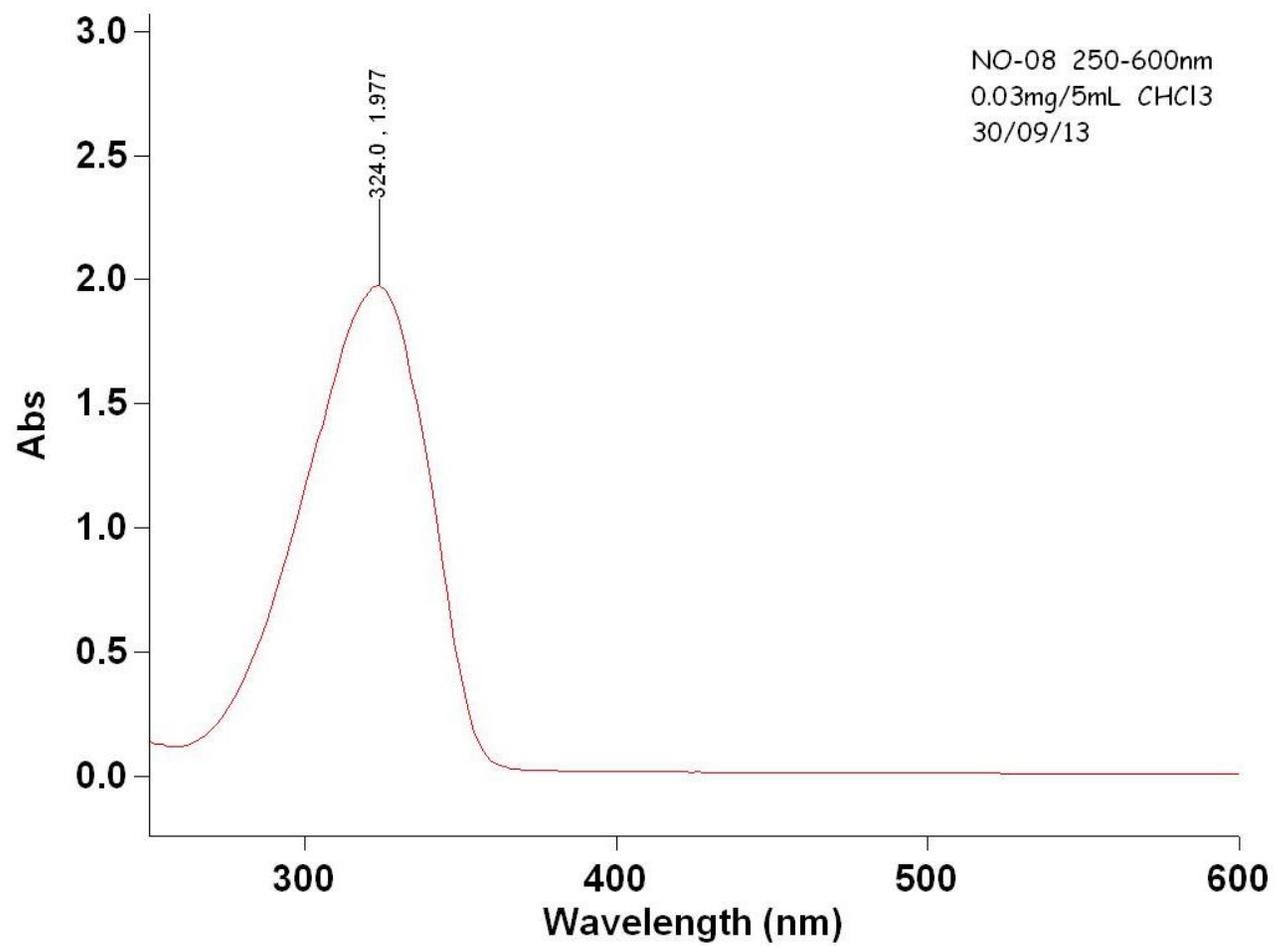
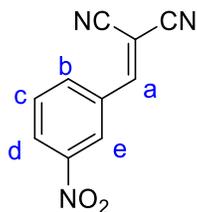


Figura 93 - Espectro de UV do 64e

2-(3-Nitrobenzilideno)malononitrila



64f

O produto **64f** foi obtido com a metodologia 6.3.1. em 4 horas com um rendimento de 81%. Este produto apresenta-se como um sólido de coloração branco e ponto de fusão de 104-106°C.

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, δ ppm CDCl_3): 8,67-8,65 (1 H, *m*, Ar-H); 8,49-8,46 (1 H, *ddd*, $J = 8,3; 2,1; 0,9$ Hz, Ar-H); 8,34-8,31 (1 H, *m*, Ar-H); 7,89 (1 H, *s*, C=C(Ph)H); 7,82-7,77 (1 H, *t*, $J = 8,1$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm, CDCl_3): 157,10; 148,65; 134,92; 132,03; 131,01; 128,23; 125,51; 112,70; 111,67; 86,72.

IV (cm^{-1}): 3087 (ν de sp^2 C-H); 229, 2226 (ν_{ass} e ν_{s} de $\text{C}\equiv\text{N}$); 1596 (ν de C=C vinílico); 1528 (ν_{ass} de N-O); 1356 (ν_{s} de N-O).

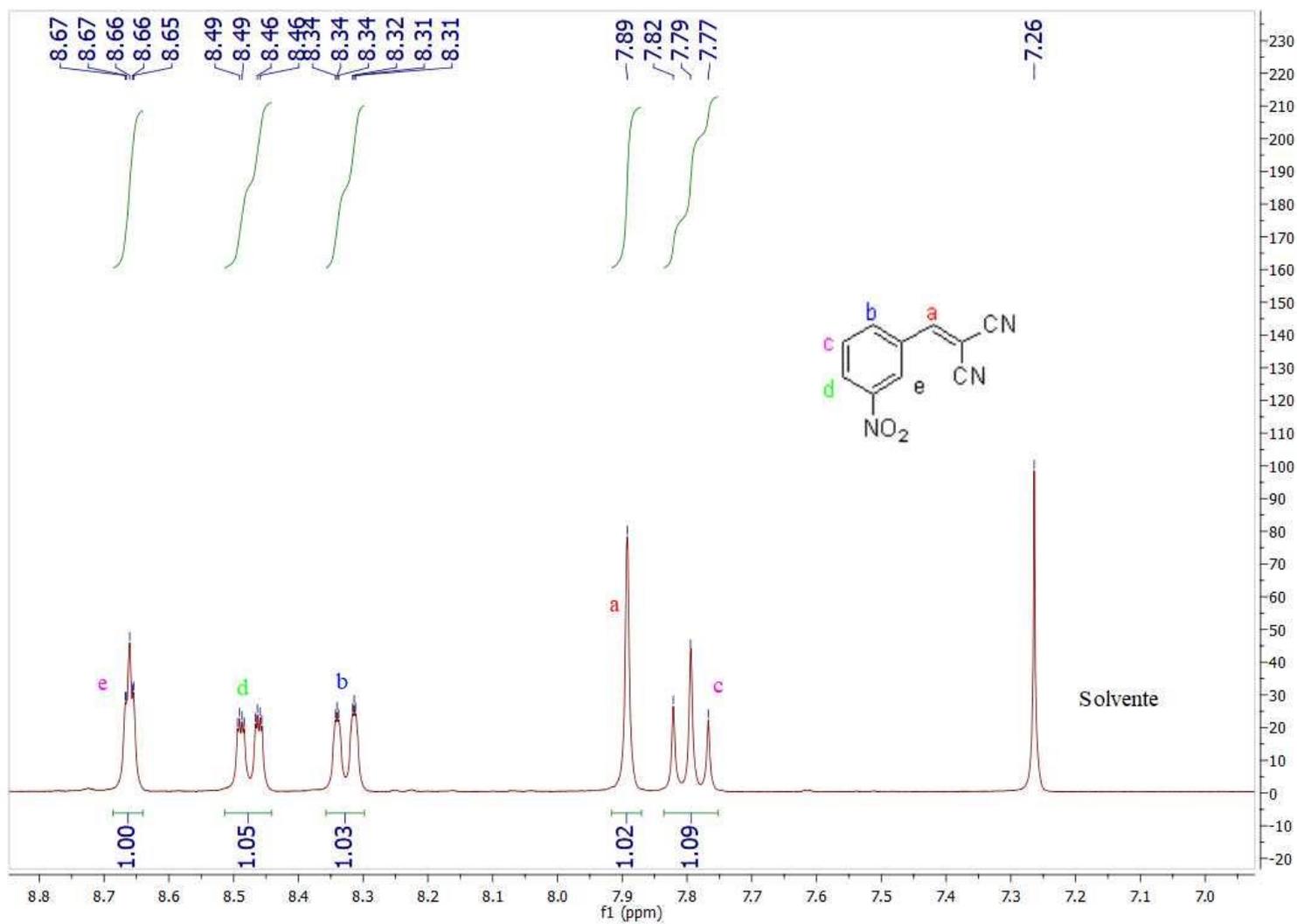


Figura 94 - Espectro de ^1H -RMN do **64f** usando CDCl_3 como solvente

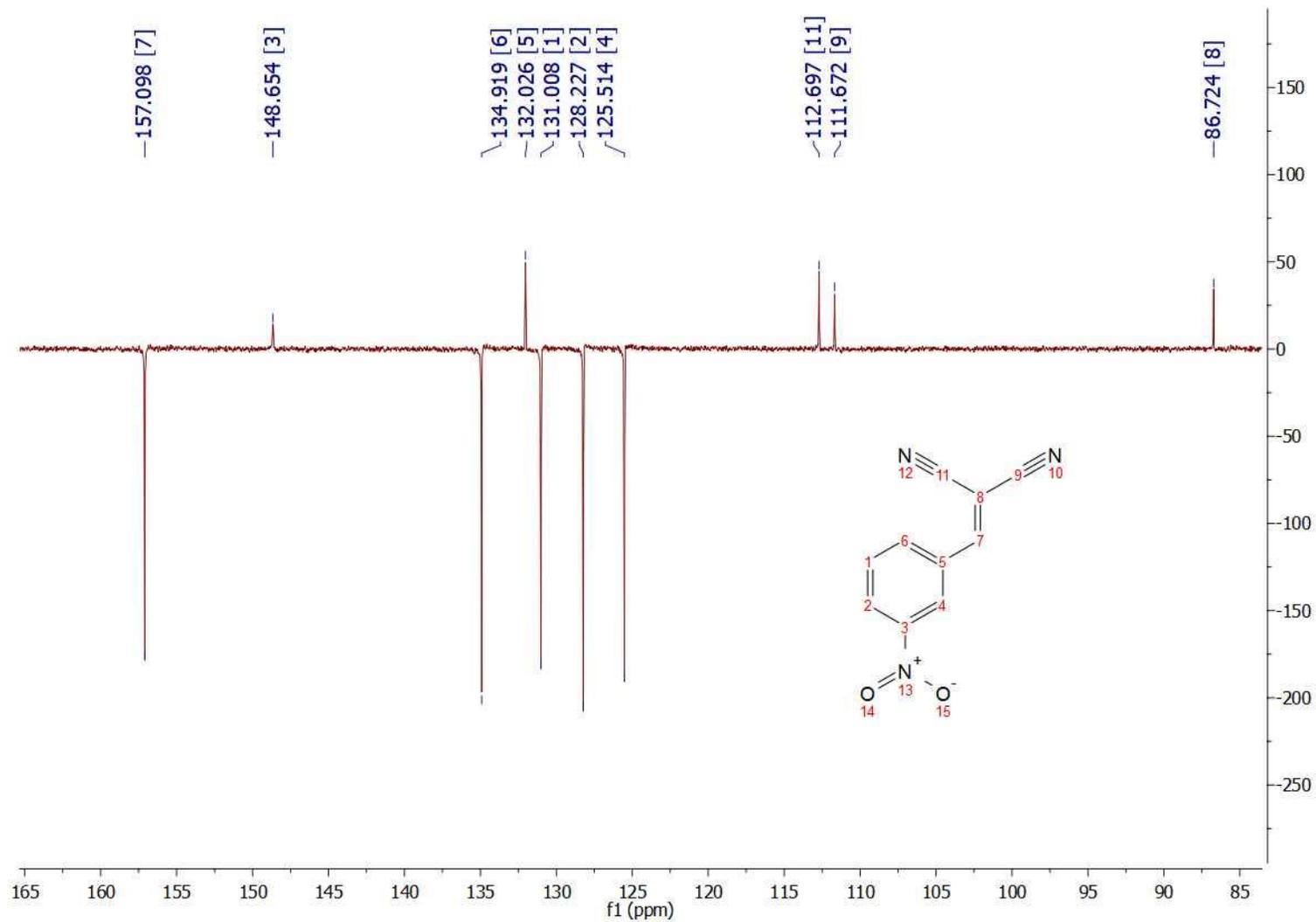


Figura 95 - Espectro de APT do **64f** usando CDCl₃ como solvente (CH e CH₃ para baixo)

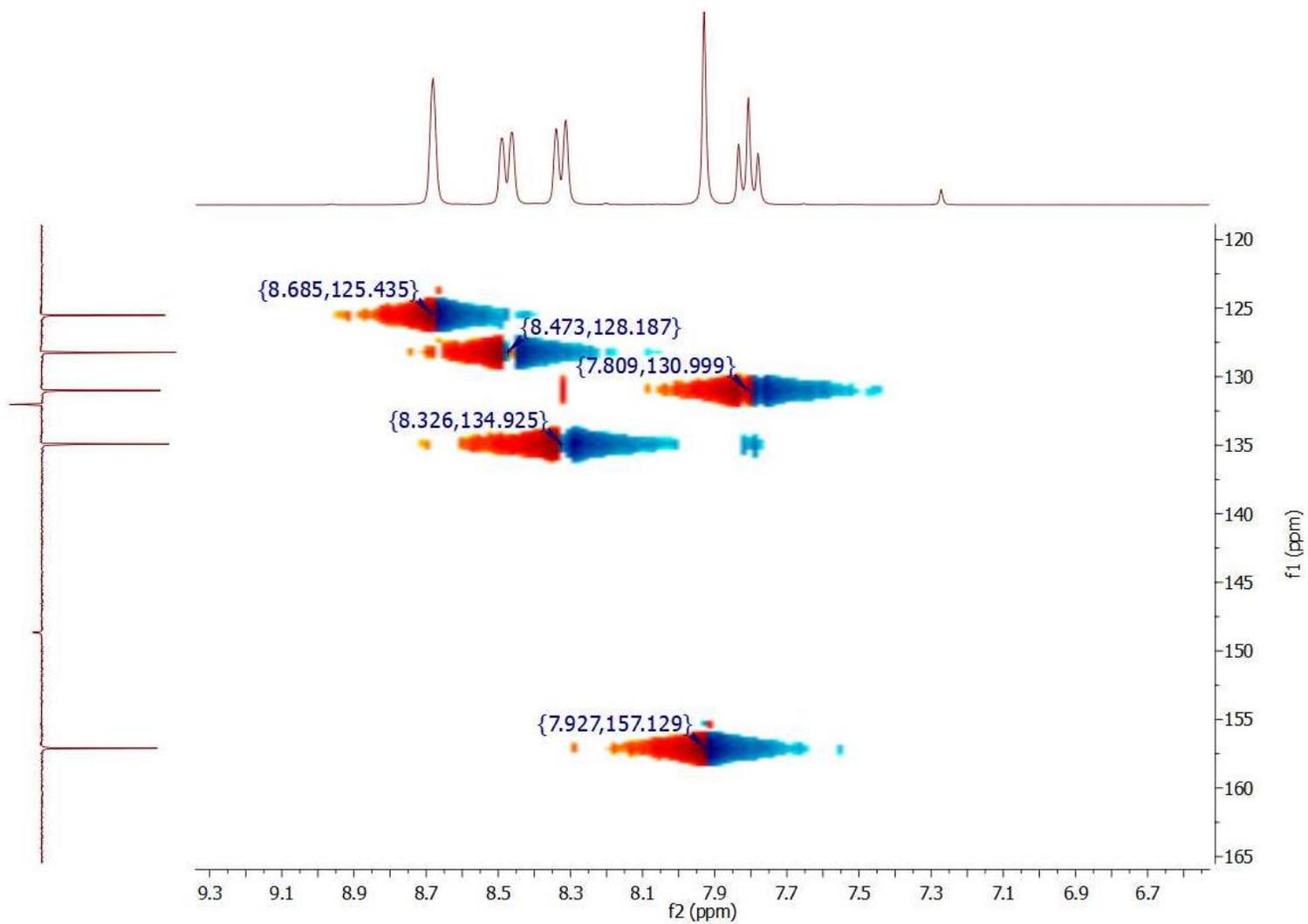


Figura 96 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **64f** usando CDCl_3 como solvente

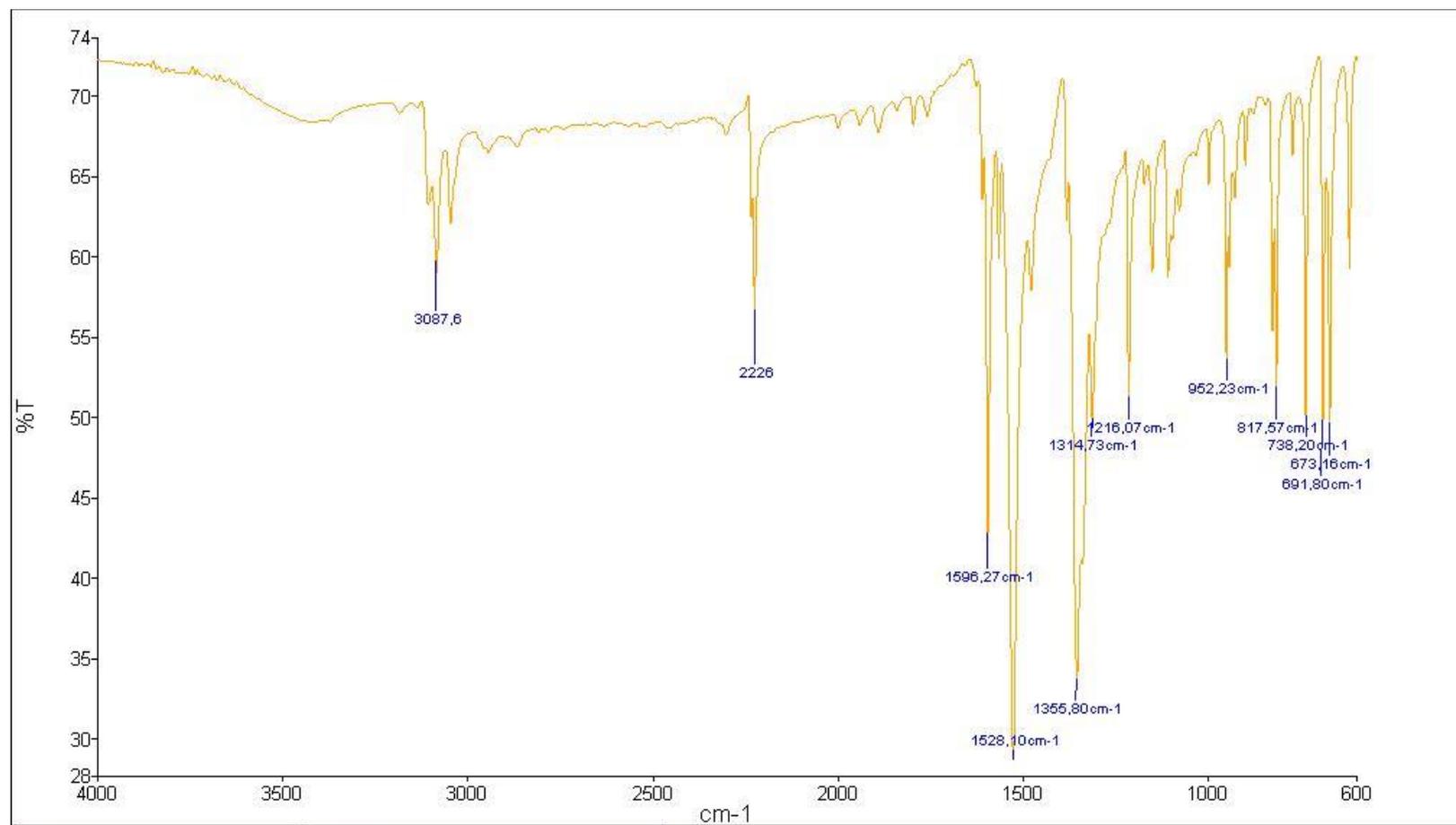


Figura 97 - Espectro de IV do produto 64f

6.4. Obtenção de benzeno-vinilnitrilas contendo uma porção borono (boronotirfostinas) através da reação de Knoevenagel com aldeídos de ácidos borônicos comerciais

Compostos α , β -insaturados (**65a-65d**), contendo a porção borono e variando o metileno ativo utilizado, foram obtidos a partir da reação de Knoevenagel.

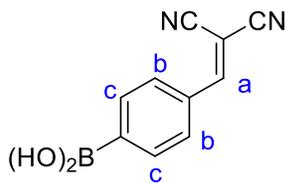
6.4.1. Utilizando a malononitrila como metileno ativo

Em um balão de 25 mL, com agitador magnético, foram adicionados respectivamente os seguintes reagentes 2 mmol do ácido formilfenilborônico **63a-b**, 2 mmol de malononitrila **62a** e 10 mL de água. Um condensador de refluxo foi acoplado ao sistema e ele foi mantido sob refluxo em banho de óleo.

Após o término da reação o balão contendo a mistura reacional foi retirado do banho permitindo assim que o produto resfriasse. Em seguida, realizou-se uma filtração à vácuo e o produto foi lavado com água gelada. O consumo dos reagentes foi acompanhado por c.c.f., utilizando como eluente uma mistura dicloroetano/metanol e como revelador a 2,4-dinitrofenilhidrazina e a luz UV de comprimento 254 nm.

Os produtos dessa reação foram caracterizados por $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, IV e Raio-X.

Ácido (4-(2,2-dicianovinil)fenil)borônico



65a

O produto **65a** foi obtido com a metodologia 6.4.1. em 2,5 h com um rendimento de 86%. O composto apresenta-se como um sólido de coloração branca e ponto de decomposição de 301-303 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, δ ppm, DMSO): 8,484 (1 H, s, C=(Ph)H); 8,175 (2 H, s, B(OH)₂); 7,962-7,945 (2 H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H); 7,894-7,877 (2 H, d, $J = 8,2$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm, DMSO): 162,03; 135,12; 132,85; 129,63; 114,55; 113,59; 82,35.

IV (cm^{-1}): 3433 (ν_{ass} de O-H); 3341 (ν_{s} de O-H); 3040 (ν de sp^2 C-H); 2244, 2228 (ν_{ass} e ν_{s} de $\text{C}\equiv\text{N}$); 1589 (ν de C=C); 1340 (ν de B-O).

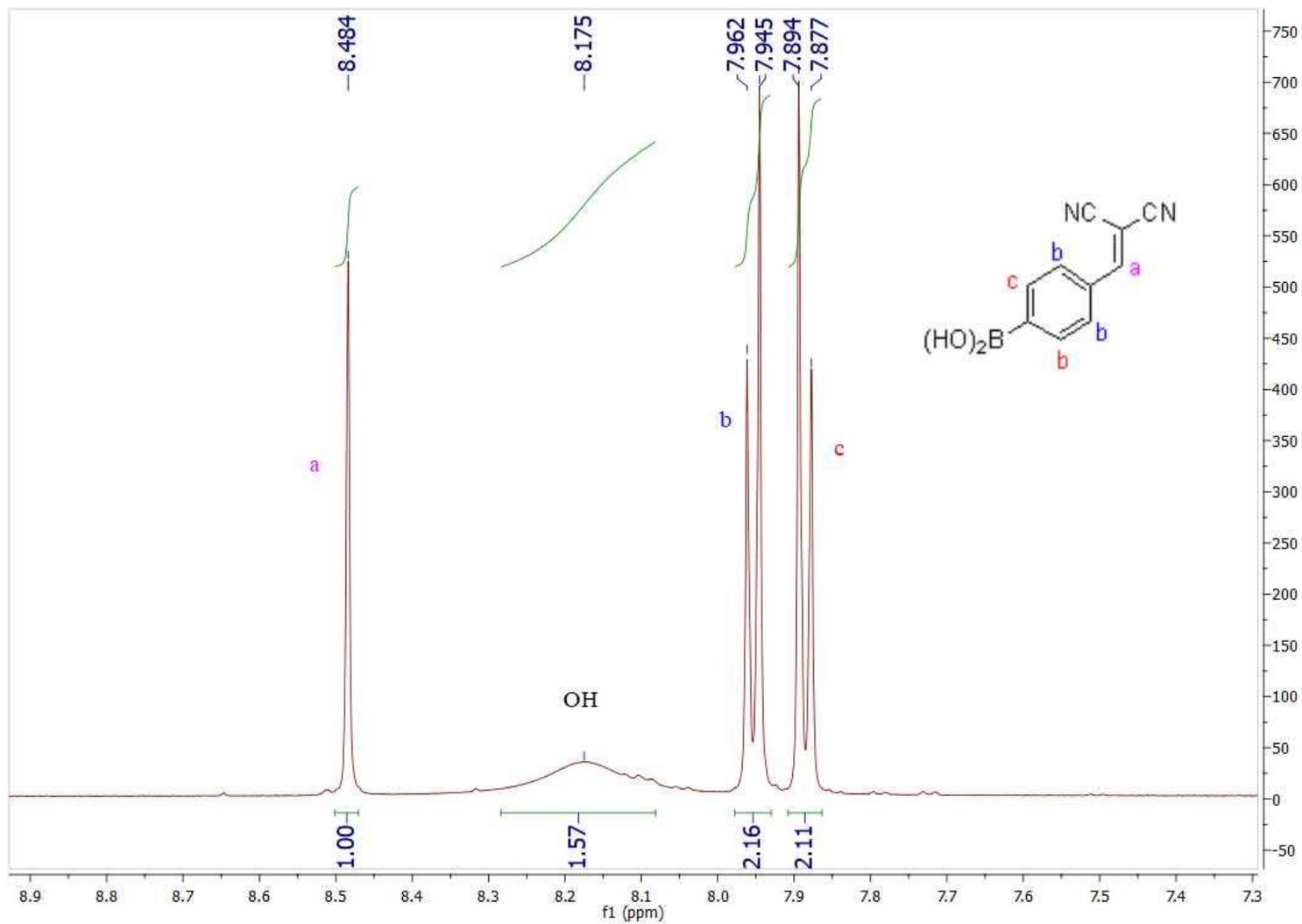


Figura 98 - Espectro de ^1H -RMN do **65a** usando DMSO como solvente

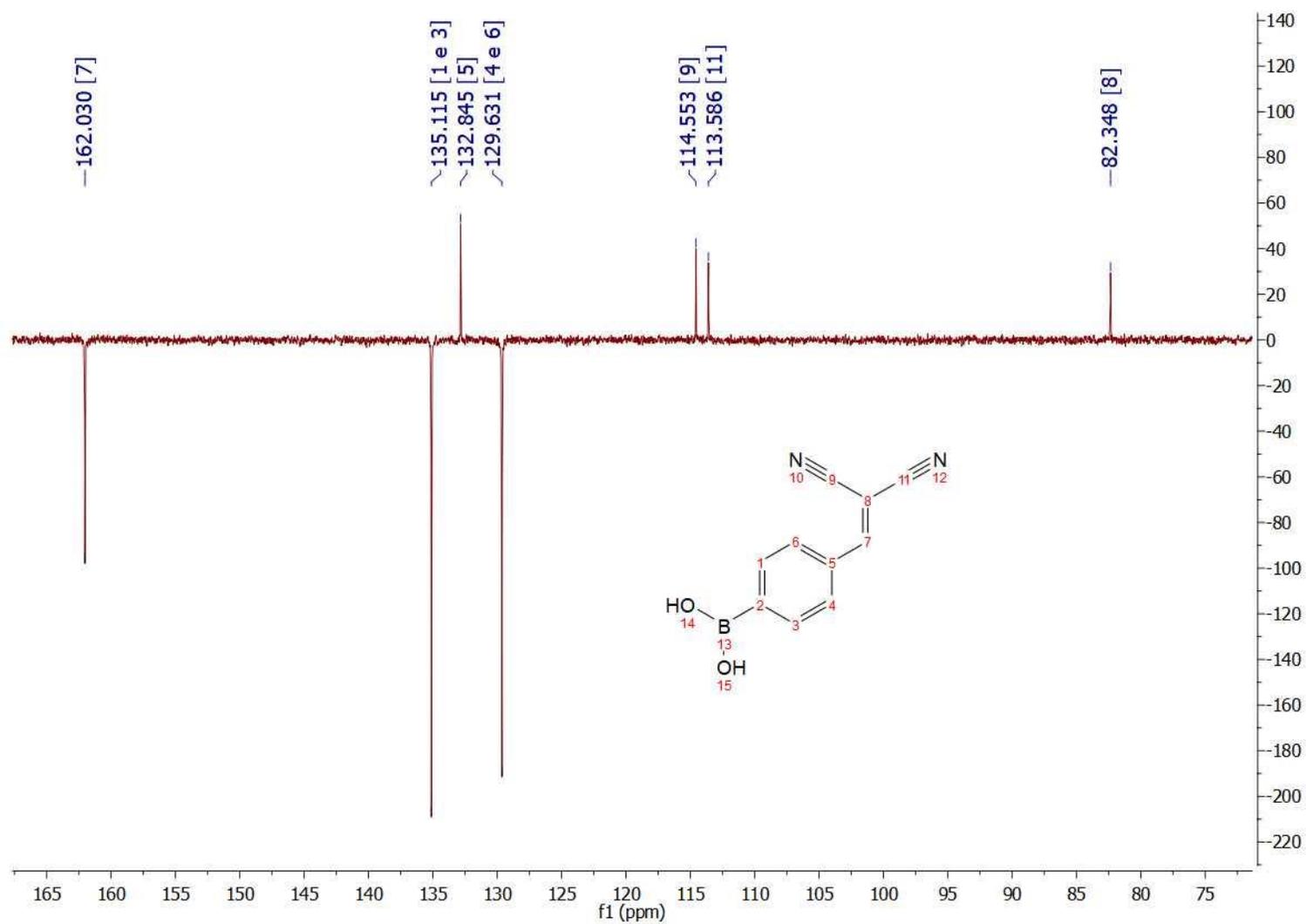


Figura 99 - Espectro de APT do 65a usando DMSO como solvente (CH e CH₃ para baixo)

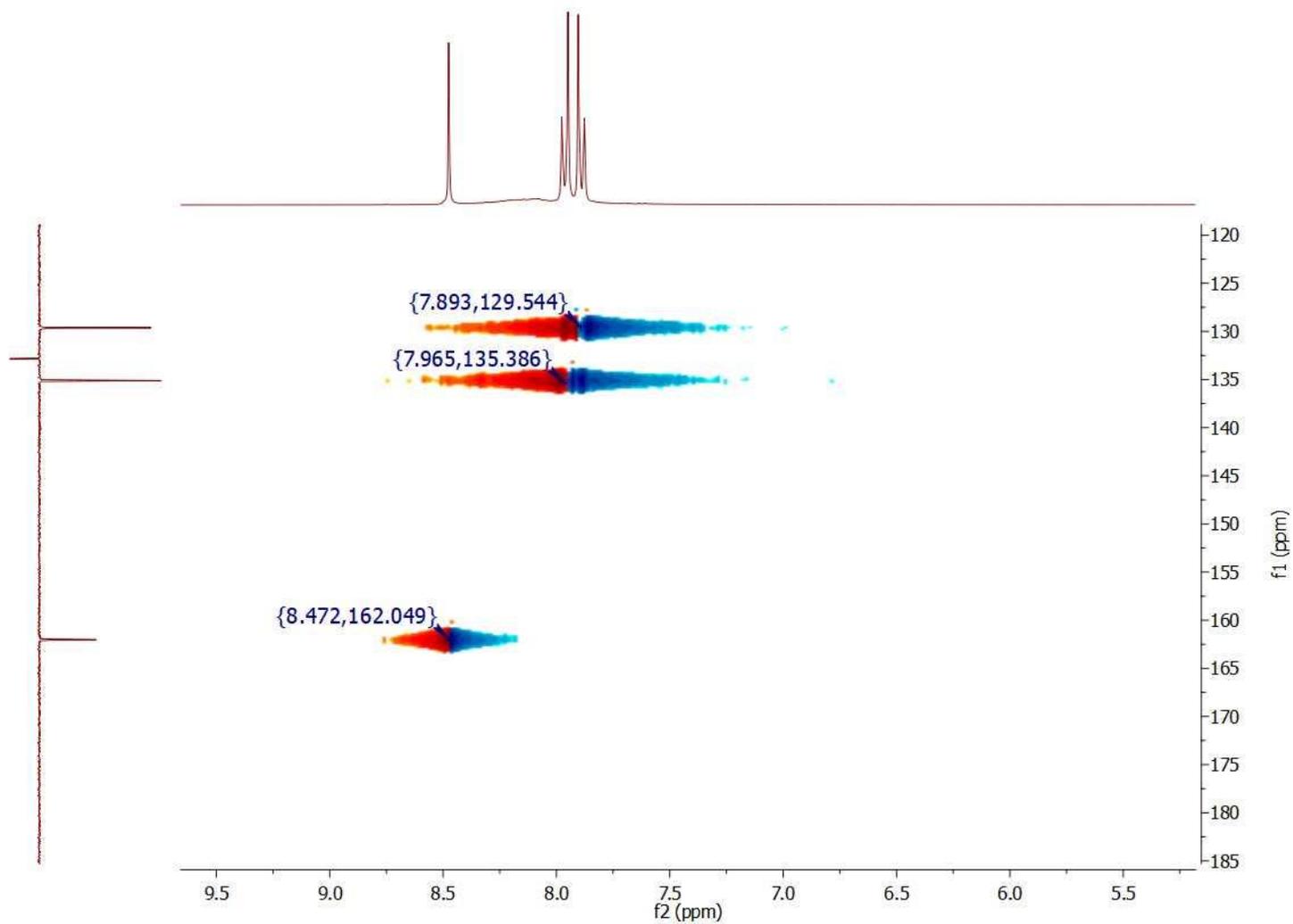


Figura 100 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **65a** usando DMSO como solvente

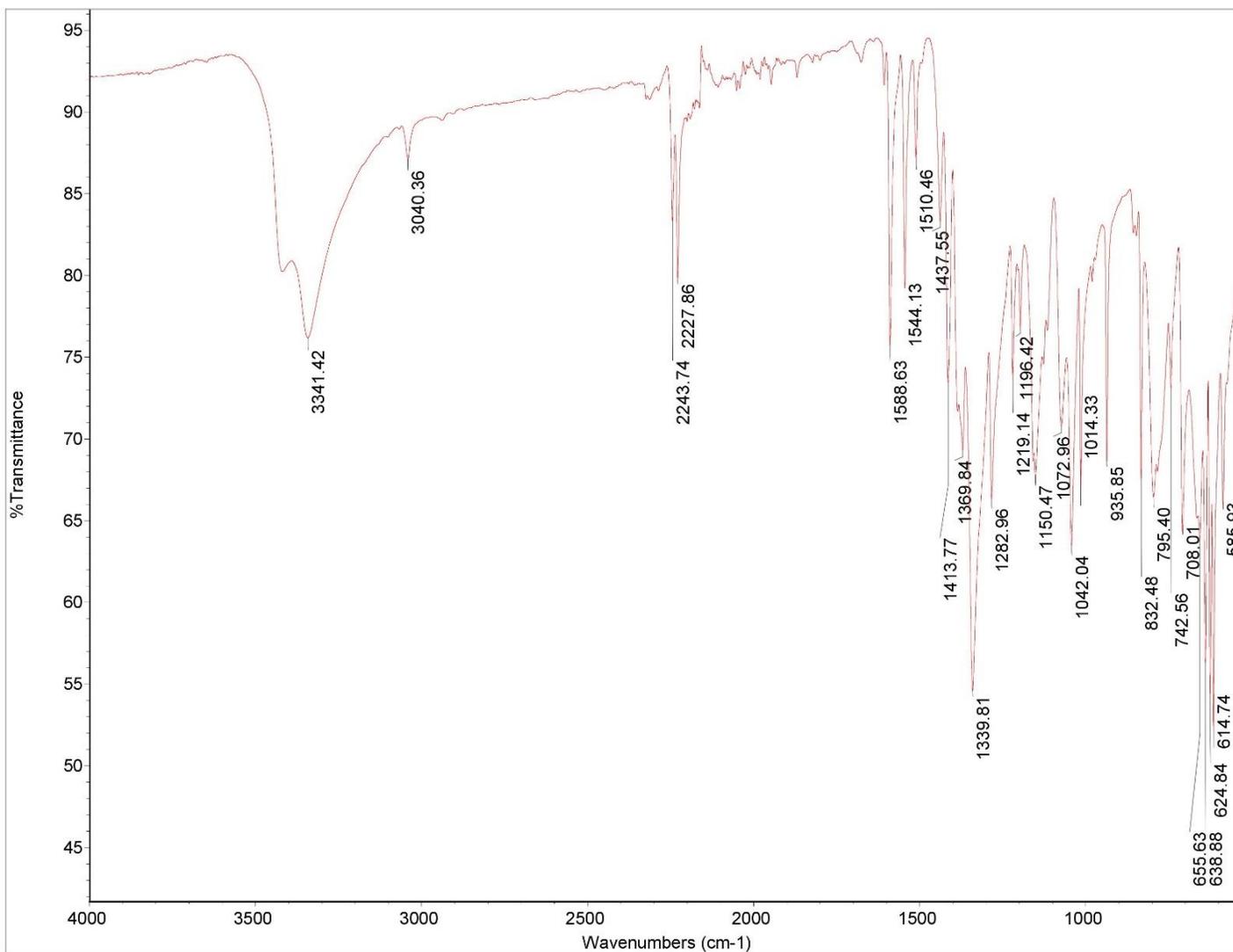


Figura 101 - Espectro de IV do produto 65a

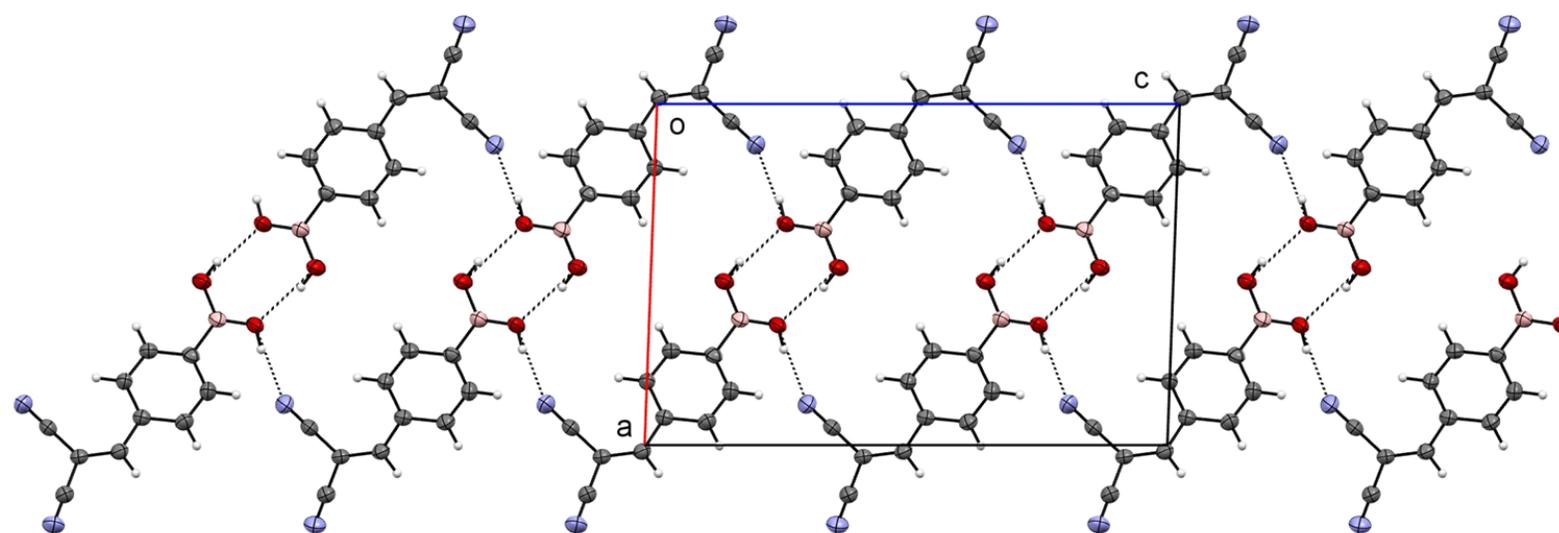
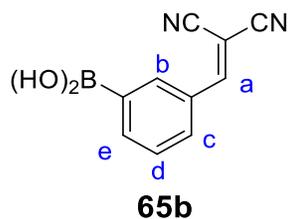


Figura 102 – Difração de raio-x para cristal do composto **65a**

Ácido (3-(2,2-dicianovinil)fenil)borônico



O produto **65b** foi obtido com a metodologia 6.4.1. em 2,5 h com um rendimento de 91%. O composto apresenta-se como um sólido de coloração branca e ponto de decomposição de 265-268°C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, δ ppm, DMSO): 8,505 (1 H, s, C=C(Ph)H); 8,306 (1 H, s, Ar-H); 8,181 (2 H, s, B(OH)₂); 8,068-8,053 (1 H, *d*, $J = 7,5$ Hz, Ar-H); 8,005-7,989 (1 H, *d*, $J = 7,5$ Hz, Ar-H); 7,603-7,572 (1 H, *dd*, $J = 7,5; 8,0$ Hz, Ar-H).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm, DMSO): 161,77; 139,42; 136,37; 131,16; 130,33; 128,19; 113,92; 112,85; 81,00.

IV (cm^{-1}): 3380 (ν_{ass} de O-H); 3292 (ν_{s} de O-H); 3020 (ν de sp^2 C-H); 2245,2225 (ν_{ass} e ν_{s} de $\text{C}\equiv\text{N}$); 1596, 1574 (ν de C=C); 1352 (ν_{ass} de B-O).

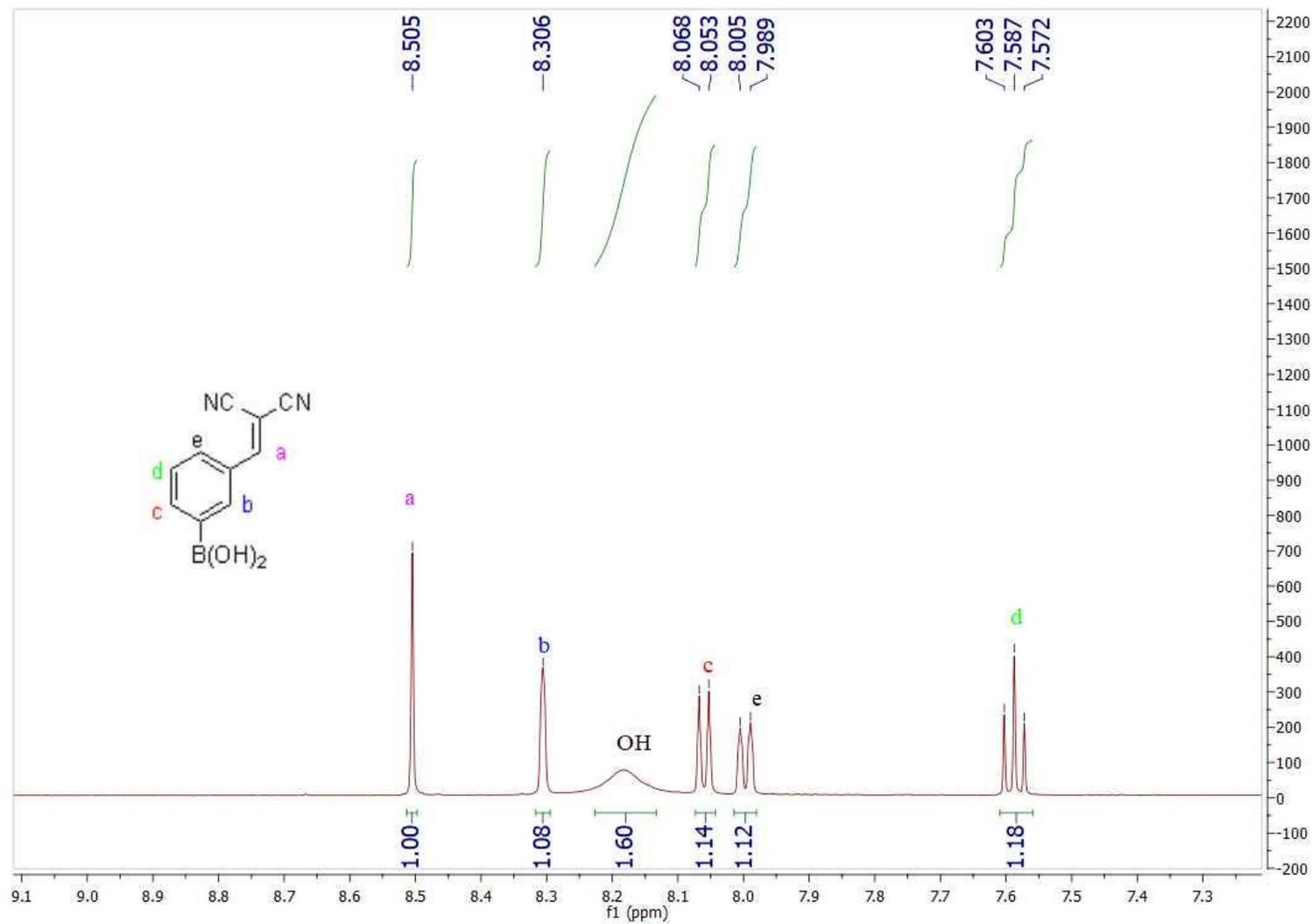


Figura 103 - Espectro de ¹H-RMN do **65b** usando DMSO como solvente

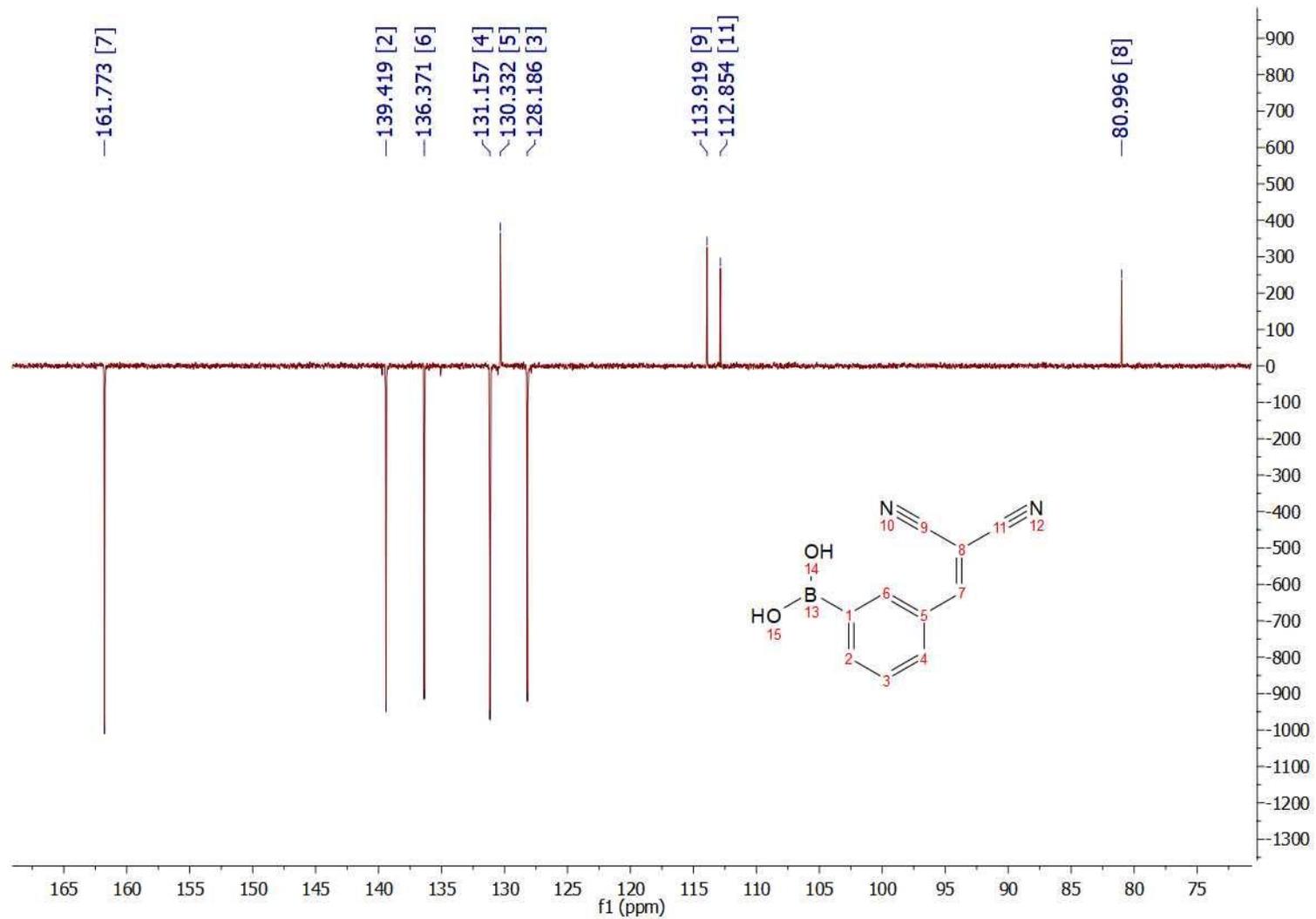


Figura 104 - Espectro de APT do **65b** usando DMSO como solvente (CH e CH₃ para baixo)

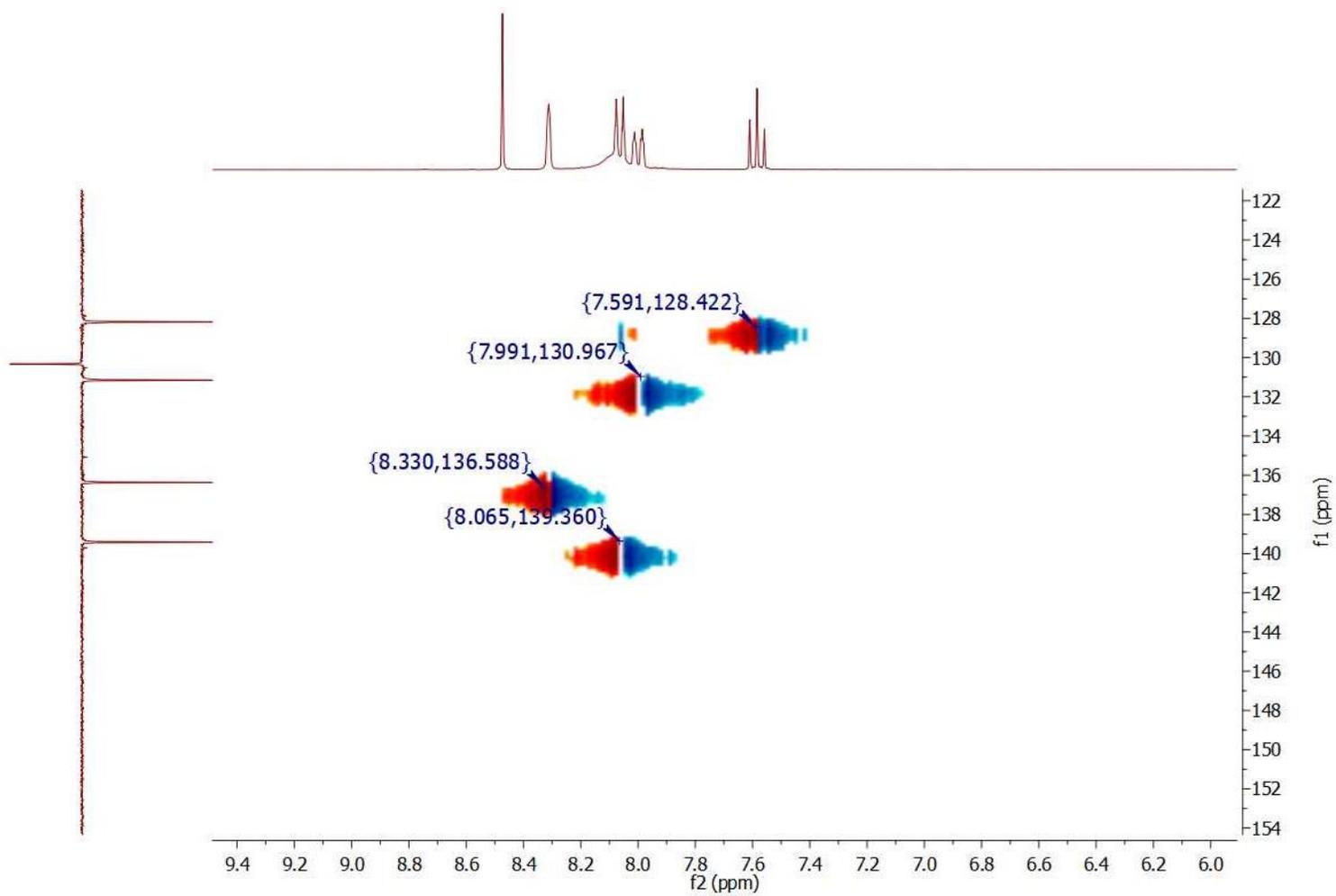


Figura 105 - Espectro de HSQC ^1H versus ^{13}C do **65b** usando DMSO como solvente

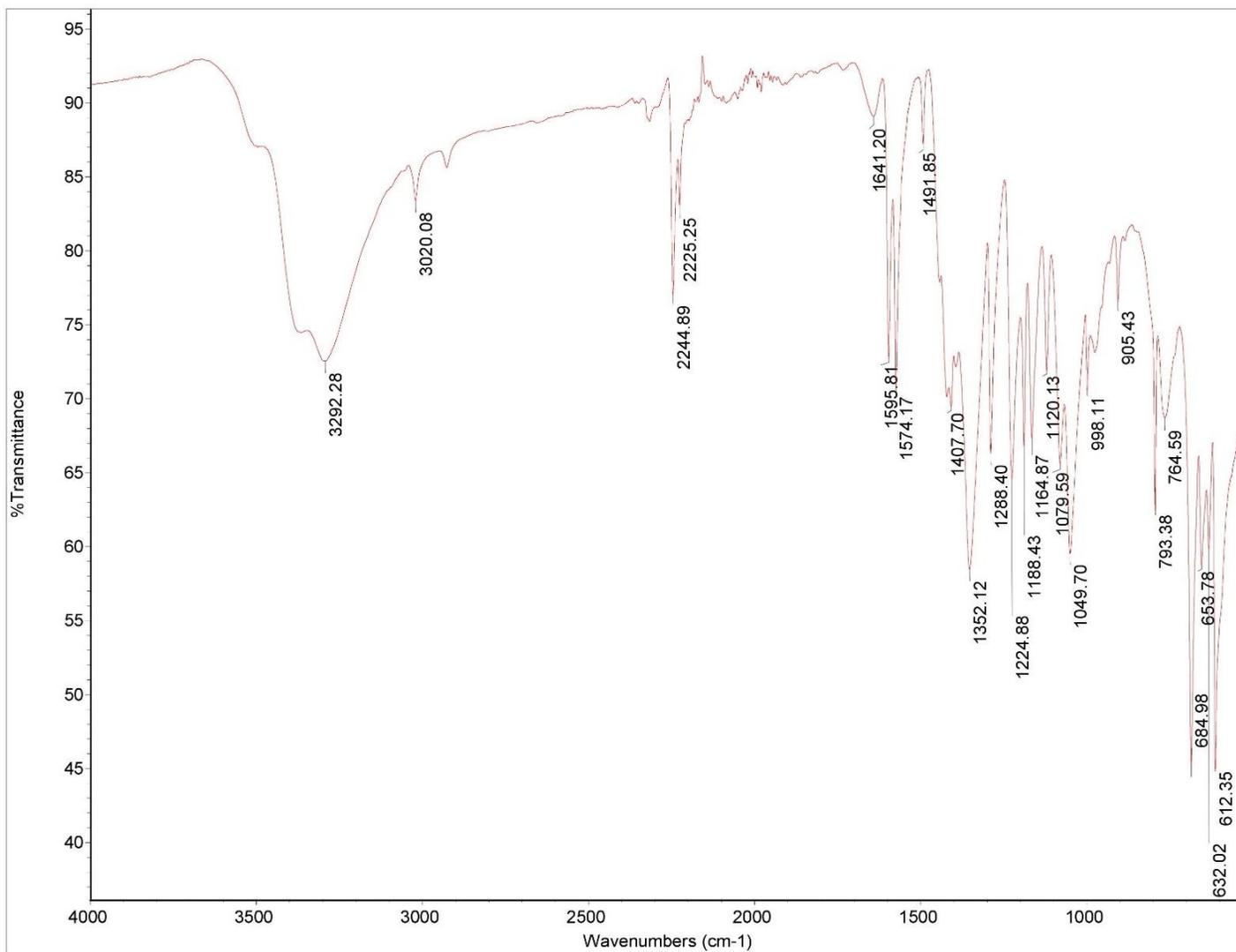


Figura 106 - Espectro de IV do produto 65b

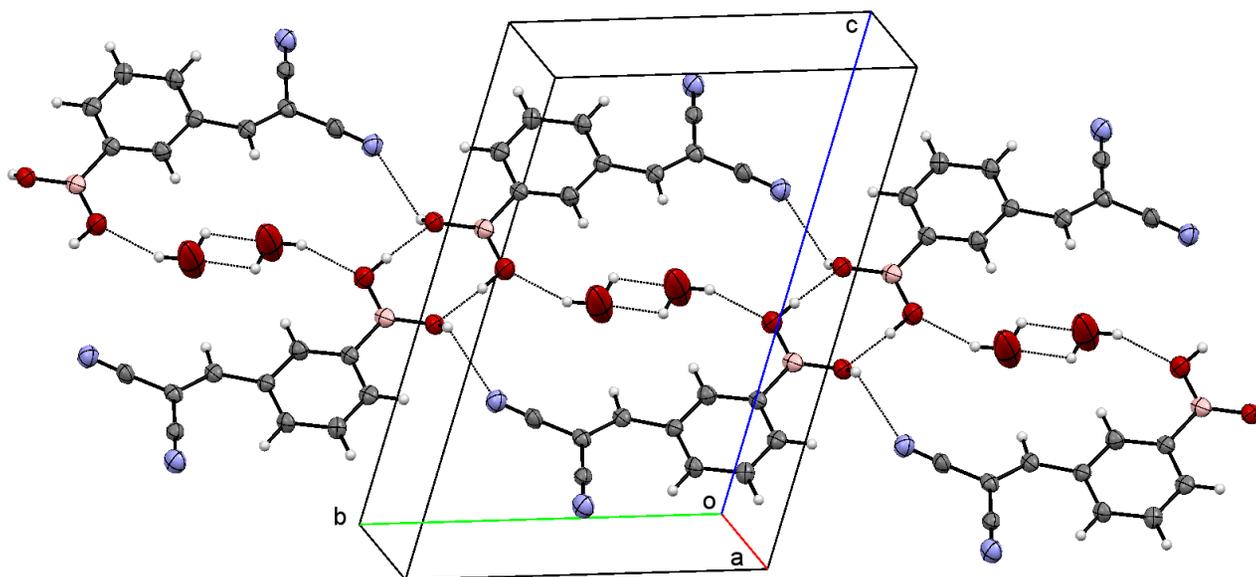


Figura 107 – Difração de raio-x para cristal do composto **65b**

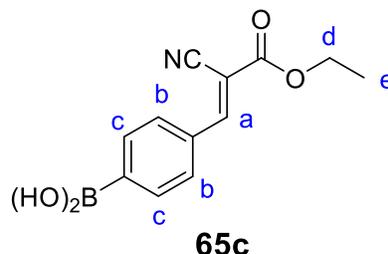
6.4.2. Utilizando o cianoacetato de etila como metileno ativo

Em um balão de 25 mL, com agitador magnético, foram adicionados, respectivamente, os seguintes reagentes: 2 mmol do ácido formilfenilborônico **63a-b**, 2 mmol de cianoacetato de etila **62b** e 10 mL de água. Um condensador de refluxo foi acoplado ao sistema e a mistura foi mantida sob refluxo e agitação.

Após o término da reação, o balão contendo a mistura reacional foi retirado do banho permitindo assim que o produto resfriasse. Em seguida, realizou-se uma filtração à vácuo e o produto foi lavado com água destilada gelada. O consumo dos reagentes foi acompanhado por c.c.f., utilizando como eluente uma mistura dicloroetano/metanol e como revelador a 2,4- dinitrofenilhidrazina e a luz UV de comprimento 254 nm.

Os produtos dessa reação foram caracterizados por $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$, IV e Raio X.

Ácido (4-(2-ciano-3-ethoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico



O produto **65c** foi obtido com a metodologia 6.4.2. em 5 h com um rendimento de 84%. O composto apresenta-se como um sólido de coloração branca e ponto de decomposição de 242-243 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, δ ppm, DMSO): 8,383 (1 H, s, C=(Ph)H); 8,258 (2 H, s, B(OH)₂); 7,998-7,981 (2 H, d, J = 8,2 Hz, Ar-H); 7,949-7,932 (2 H, d, J = 8,2 Hz, Ar-H); 4,353-4,310 (2 H, q, J = 7,1 Hz, OCH₂CH₃); 1,331-1,303 (3 H, t, J = 7,1 Hz, OCH₂CH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (126 MHz, δ ppm, DMSO): 161,71; 154,99; 140,20; 134,54; 132,45; 129,48; 115,48; 102,85; 62,32; 13,90.

IV (cm⁻¹): 3334 (ν de O-H); 2966 (ν de sp² C-H); 2238 (ν de C≡N); 1719 (ν de C=O); 1607; 1549 (ν de C=C); 1331 (ν de B-O); 1264 (ν de C-O) .

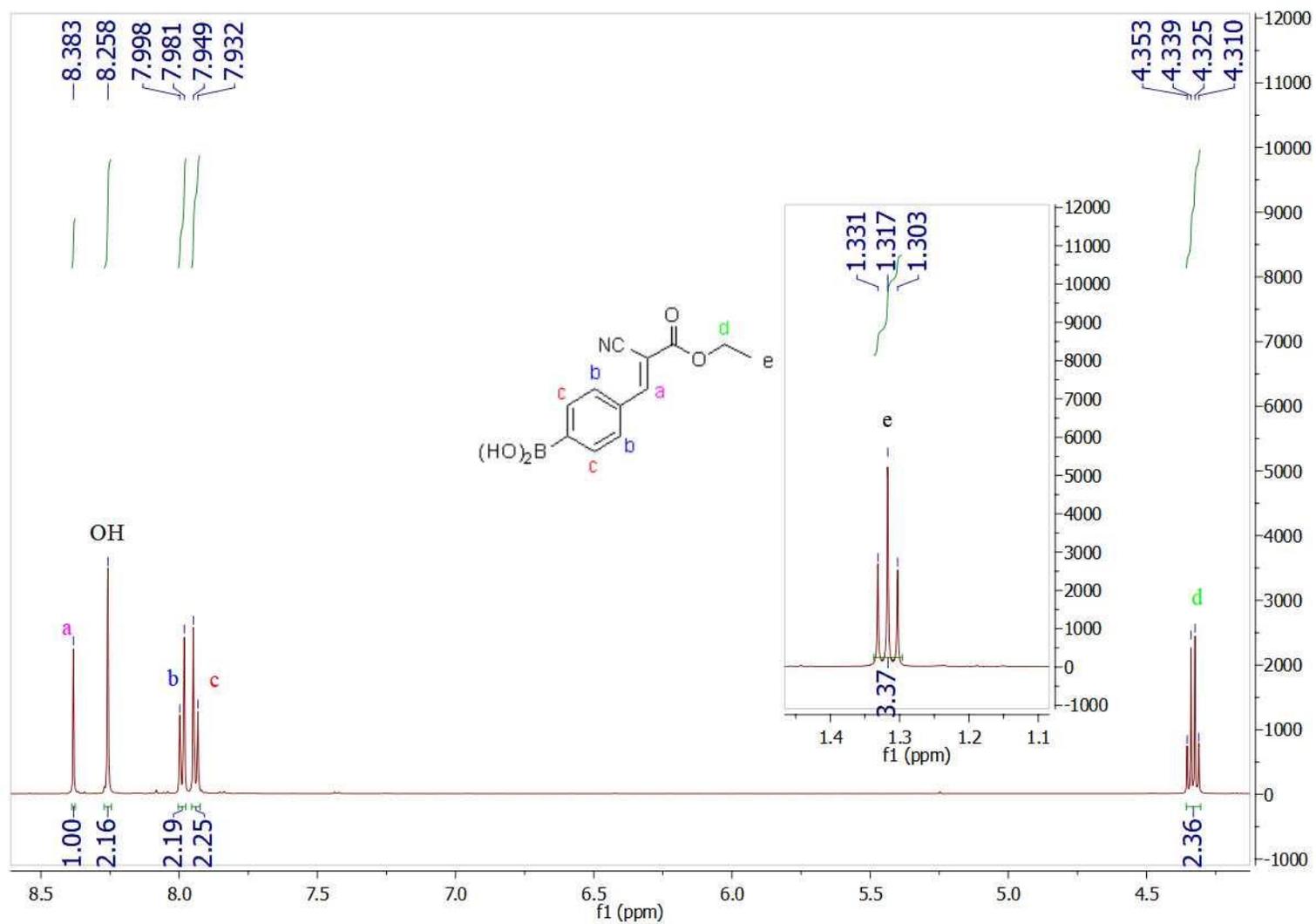


Figura 108 - Espectro de ¹H-RMN do **65c** usando DMSO como solvente

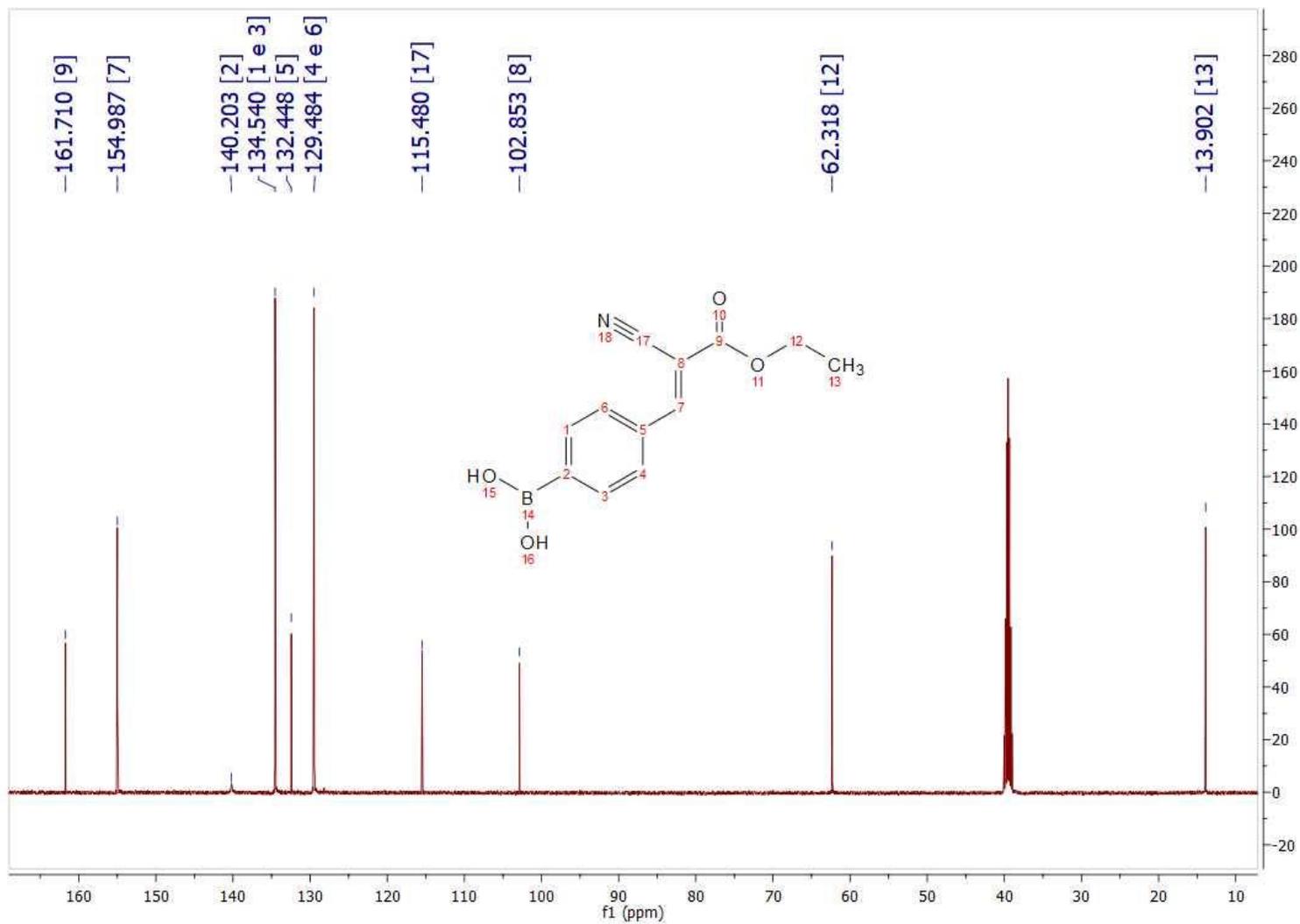


Figura 109 - Espectro de ^{13}C -RMN do **65c** usando DMSO como solvente

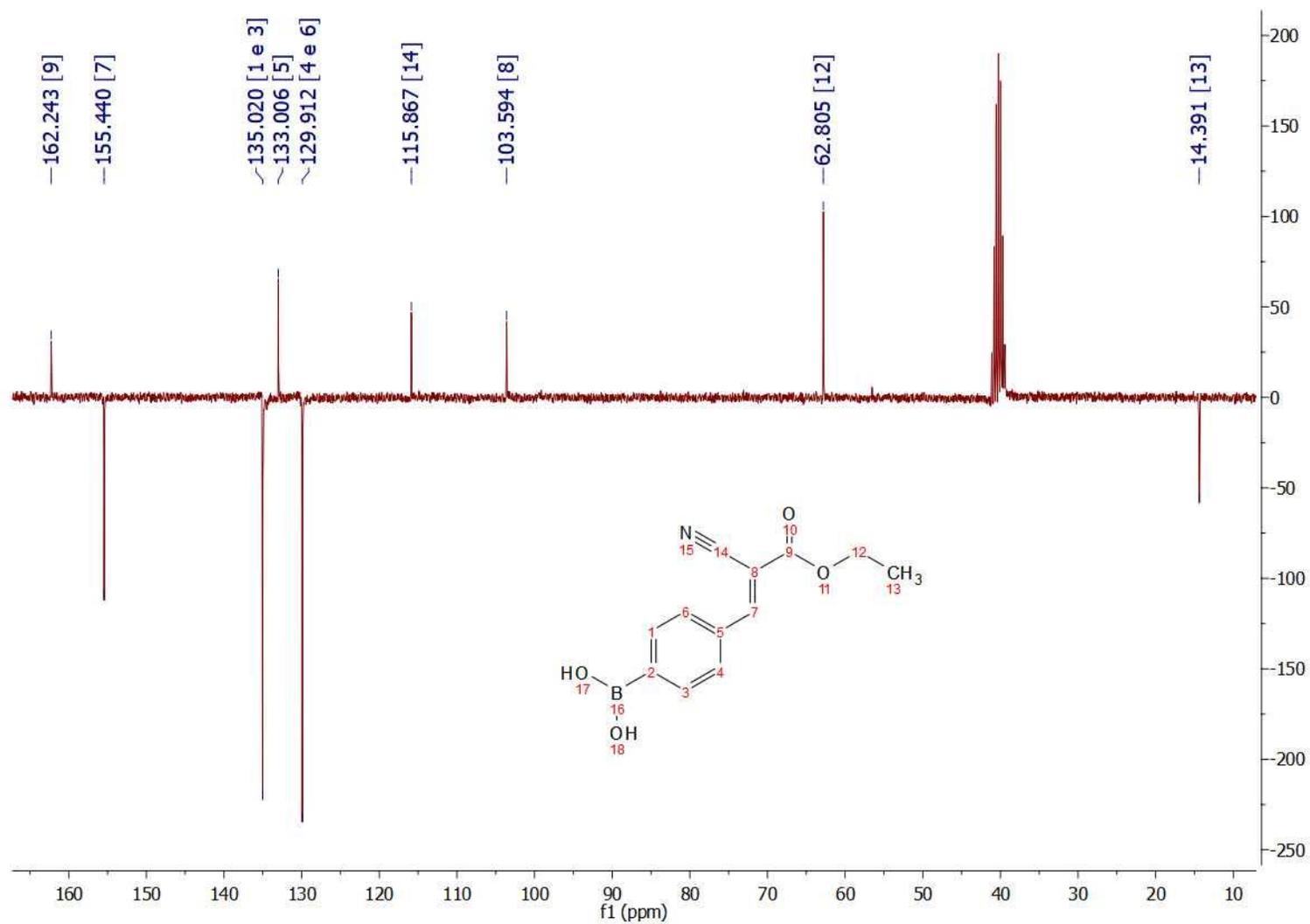


Figura 110 - Espectro de APT do **65c** usando DMSO como solvente (CH e CH₃ para baixo)

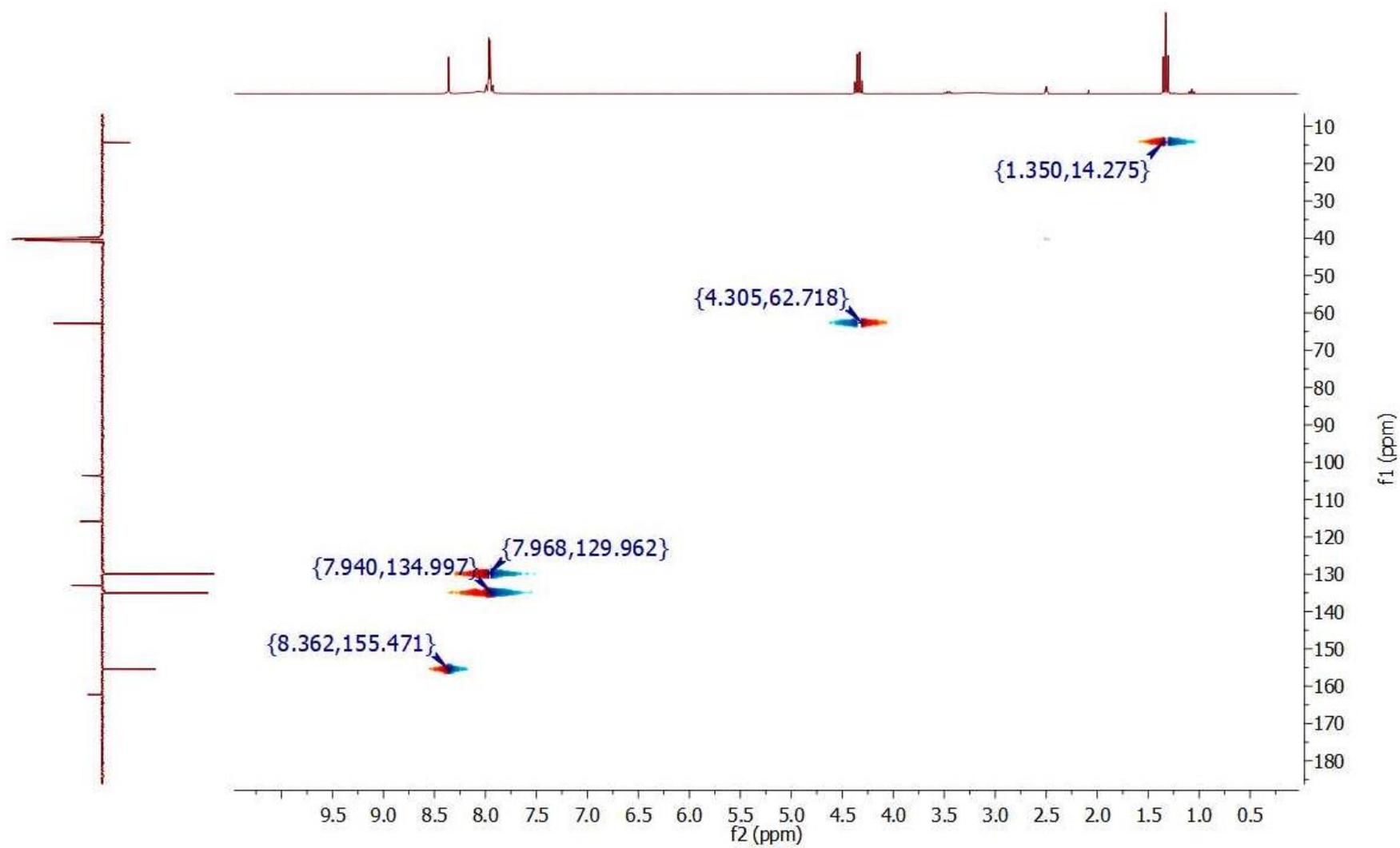


Figura 111 - Espectro de HSQC do **65c** usando DMSO como solvente

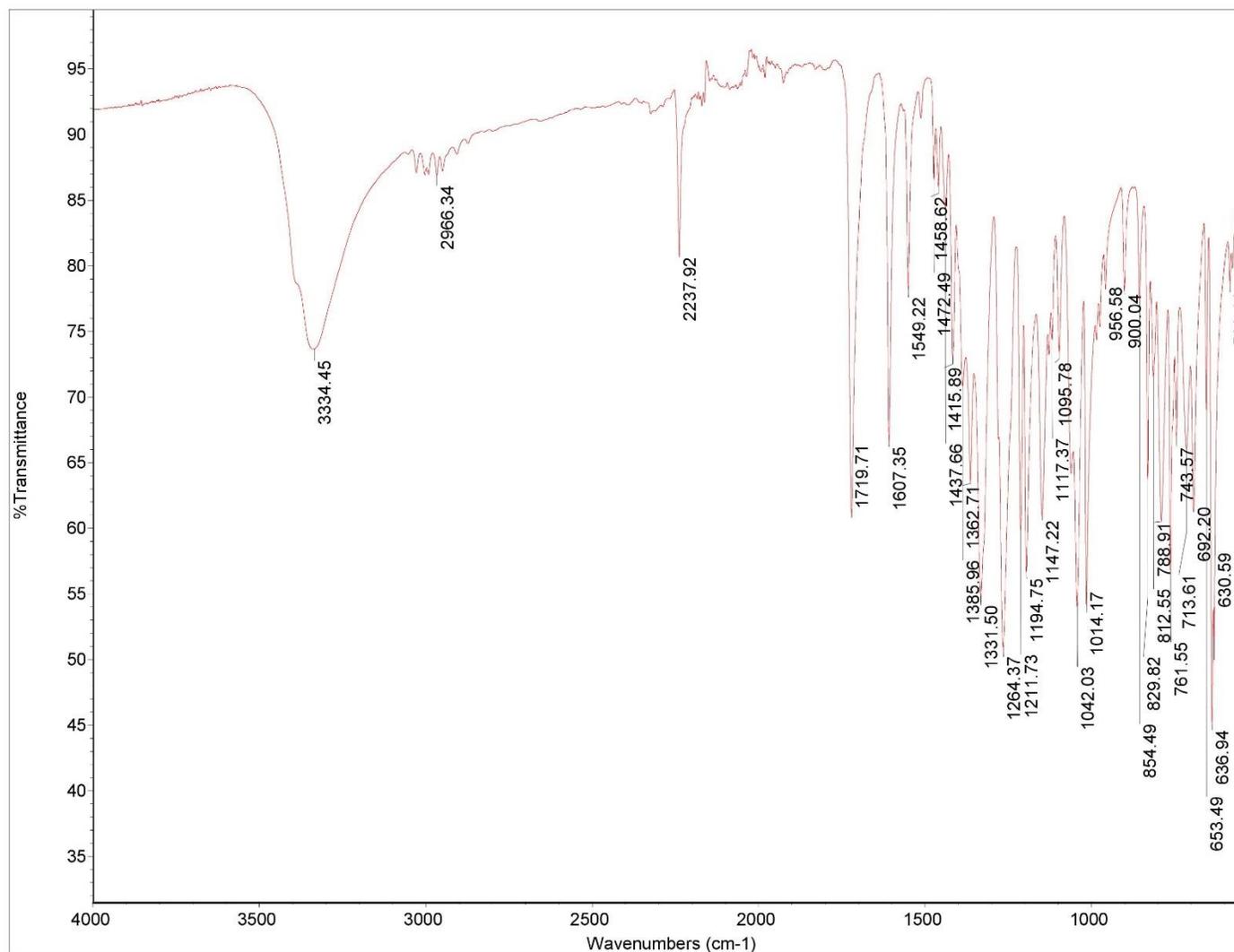


Figura 112 - Espectro de IV do produto 65c

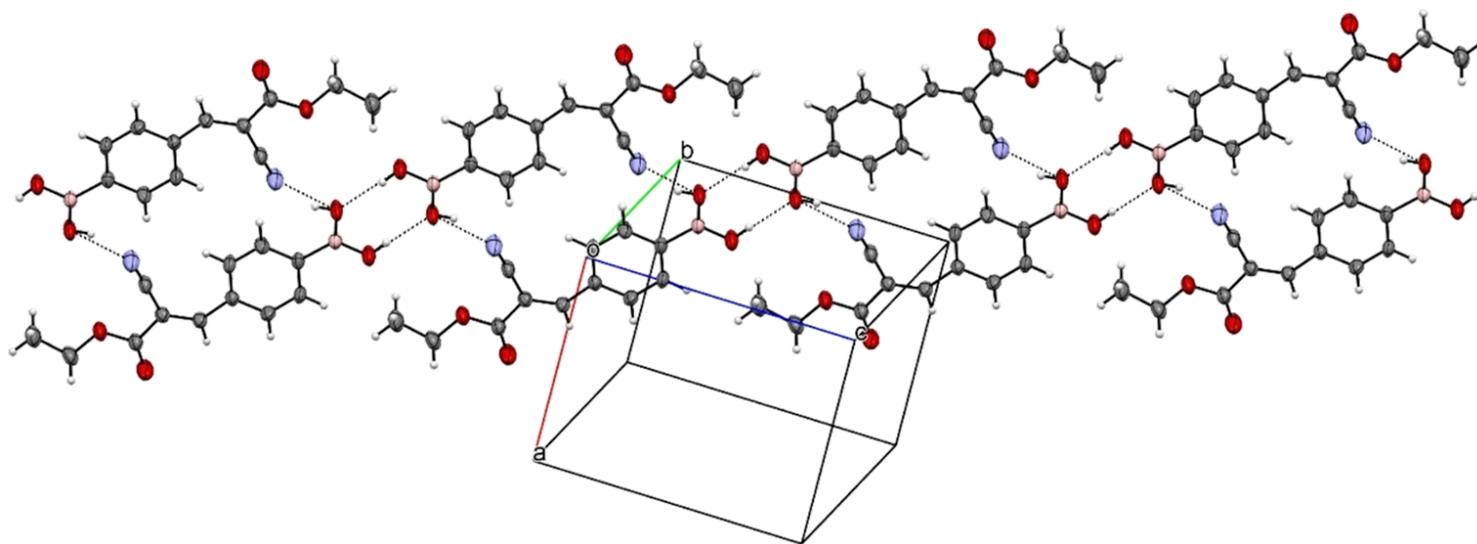
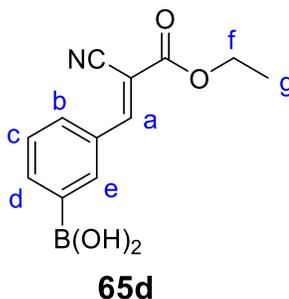


Figura 113 – Difração de raio-x para cristal do composto **65c**

Ácido (3-(2-ciano-3-ethoxi-3-oxoprop-1-en-1-il)fenil)borônico



O produto **65d** foi obtido com a metodologia 6.4.1. em 5 h com um rendimento de 87%. O composto apresenta-se como um sólido de coloração branca e ponto de decomposição de 202-206 °C.

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, δ ppm, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): 8,549 (1 H, s, Ar-H); 8,482 (1 H, s, C=(Ph)H); 8,350-7,334 (1 H, d, $J = 7,9$ Hz, Ar-H); 8,226-8,211 (1 H, d, $J = 7,4$ Hz, Ar-H); 7,730-7,700 (1 H, t, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 7,548 (2 H, s, B(OH)2); 4,509-4,466 (2 H, q, $J = 7,1$ Hz, OCH₂CH₃); 1,497-1,469 (3 H, t, $J = 7,1$ Hz, OCH₂CH₃).

$^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, δ ppm, DMSO): 8,353 (1 H, s, Ar-H); 8,347 (1 H, s, C=(Ph)H); 8,114-8,078 (1 H, m, Ar-H); 8,031-8,000 (1 H, dt, $J = 7,5; 1,0$ Hz, Ar-H); 7,584-7,533 (1 H, t, $J = 7,6$ Hz, Ar-H); 4,376-4,305 (2 H, q, $J = 7,1$ Hz, OCH₂CH₃); 1,353-1,306 (3 H, t, $J = 7,1$ Hz, OCH₂CH₃).

$^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz, δ ppm, DMSO): 162,35; 155,87; 139,23; 137,62; 131,91; 131,06; 128,76; 115,81; 103,03; 62,76; 14,40.

IV (cm^{-1}): 3365 (v de O-H); 3034 (v de sp^2 C-H); 2225 (v de C \equiv N); 1721 (v de C=O); 1597; 1579 (v de C=C); 1362 (v de B-O); 1206 (v de C-O) .

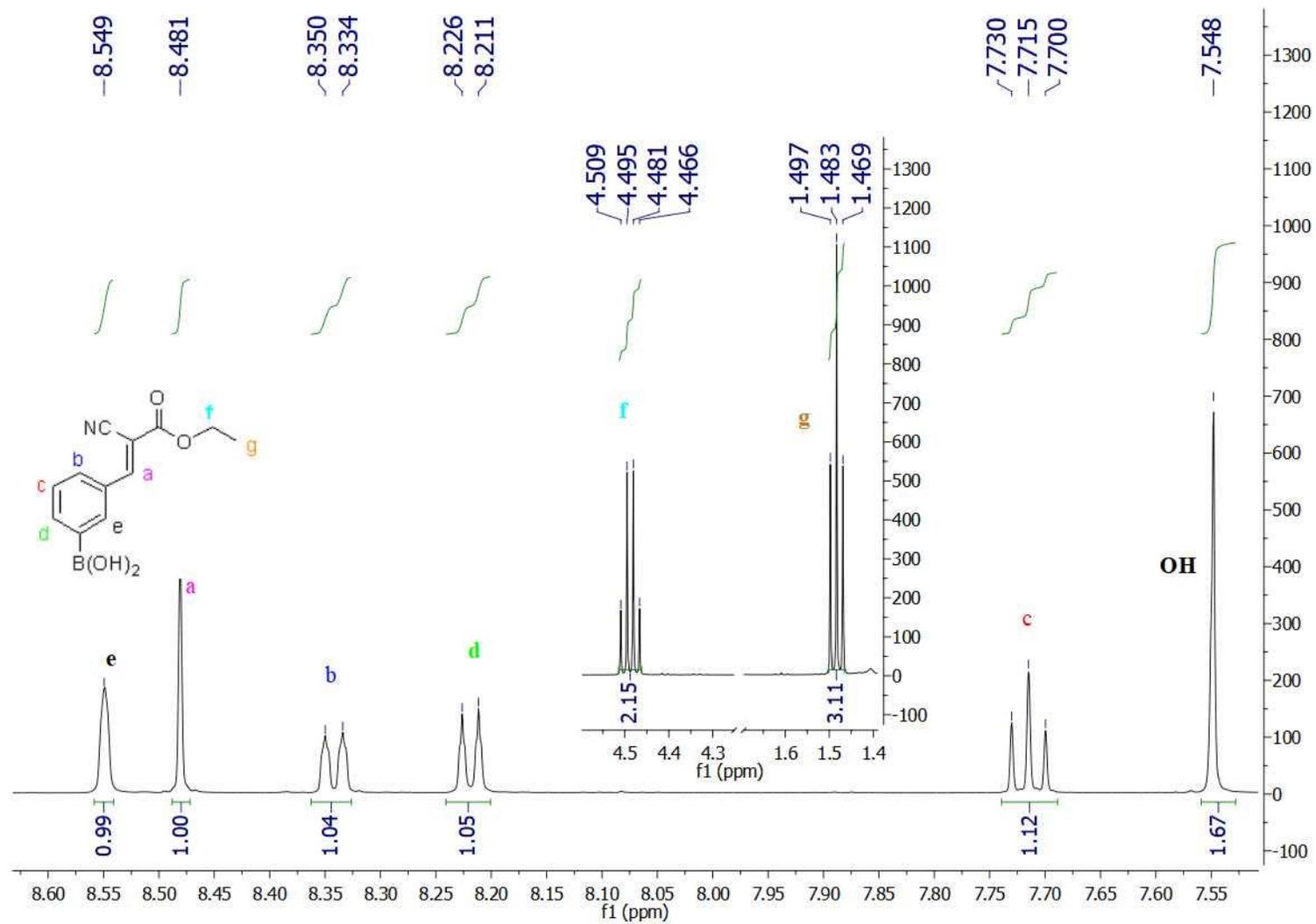


Figura 114 - Espectro de ¹H-RMN do **65d** usando acetona como solvente

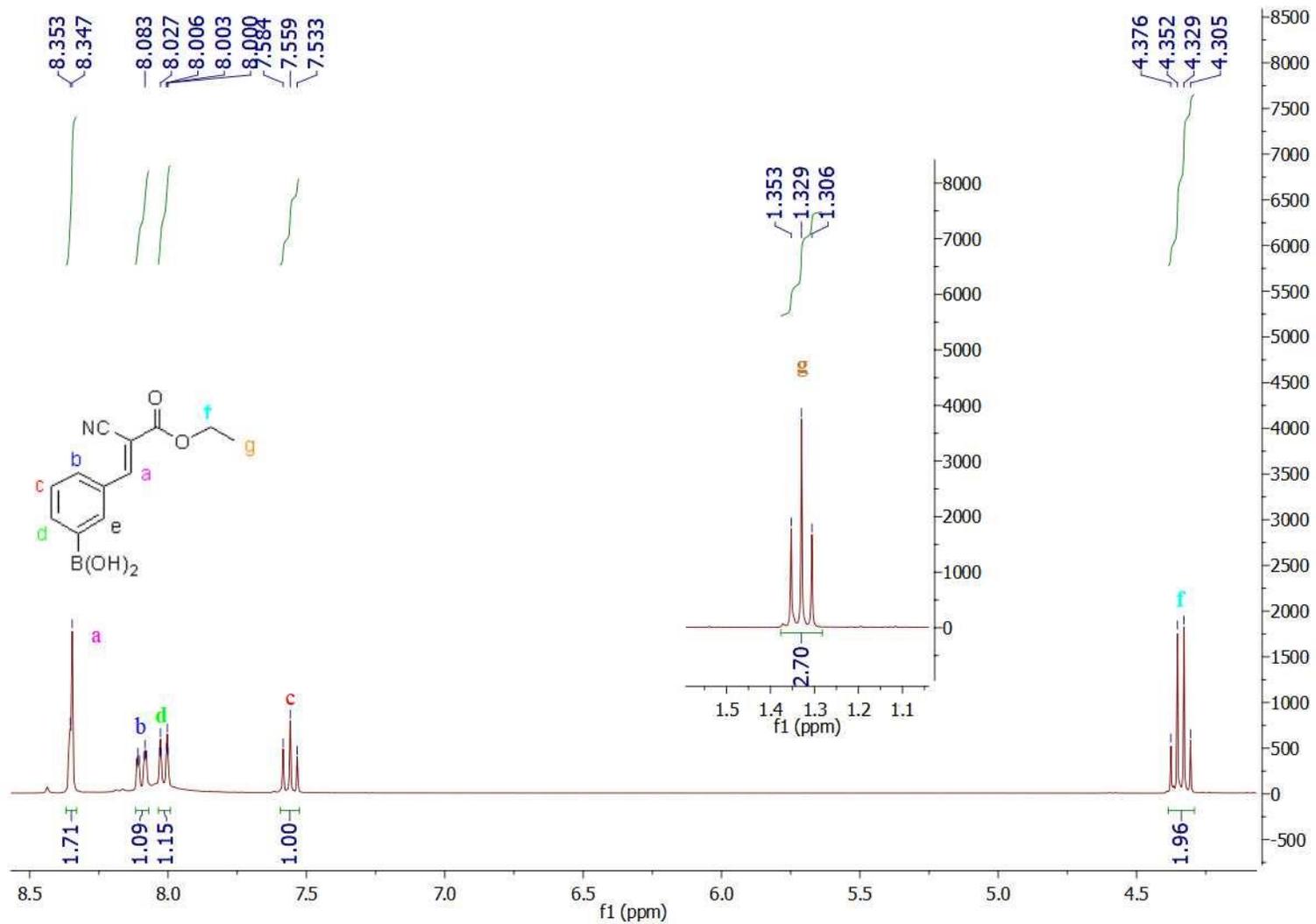


Figura 115 - Espectro de ¹H-RMN do **65d** usando DMSO como solvente

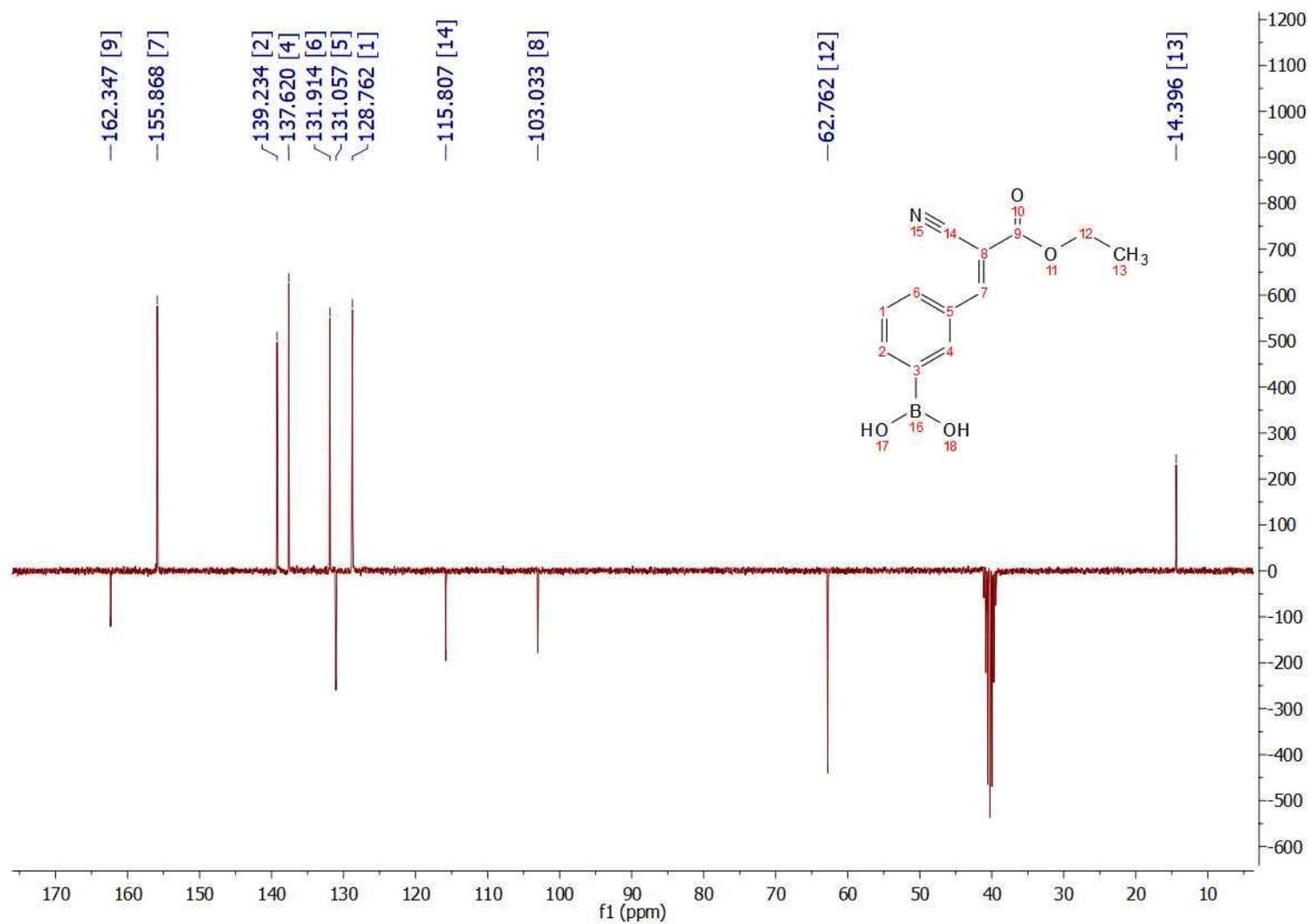


Figura 116 - Espectro de APT do **65d** usando DMSO como solvente (CH e CH₃ para cima)

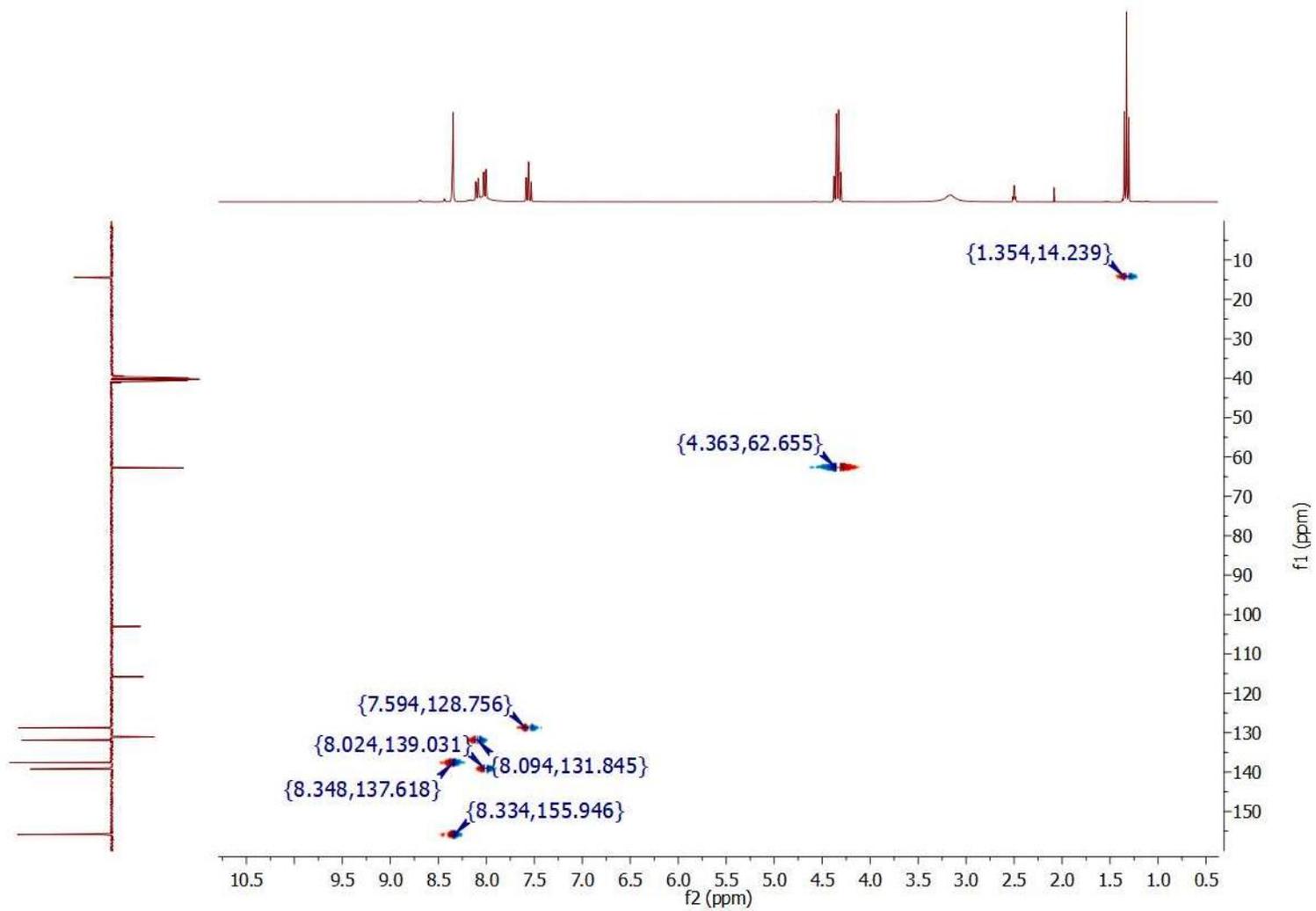


Figura 117 - Espectro de HSQC do **65d** usando DMSO como solvente

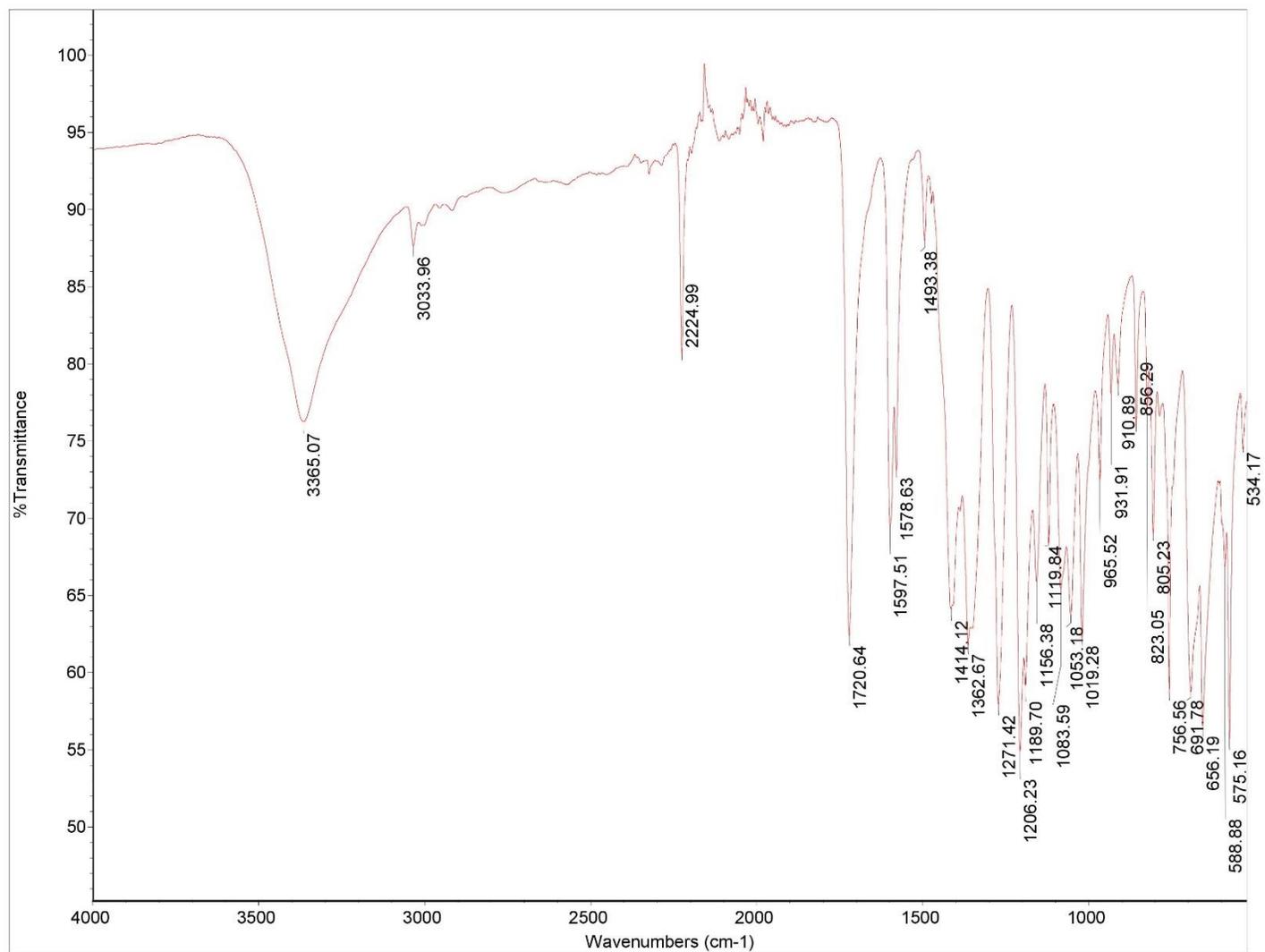


Figura 118 - Espectro de IV do produto 65d

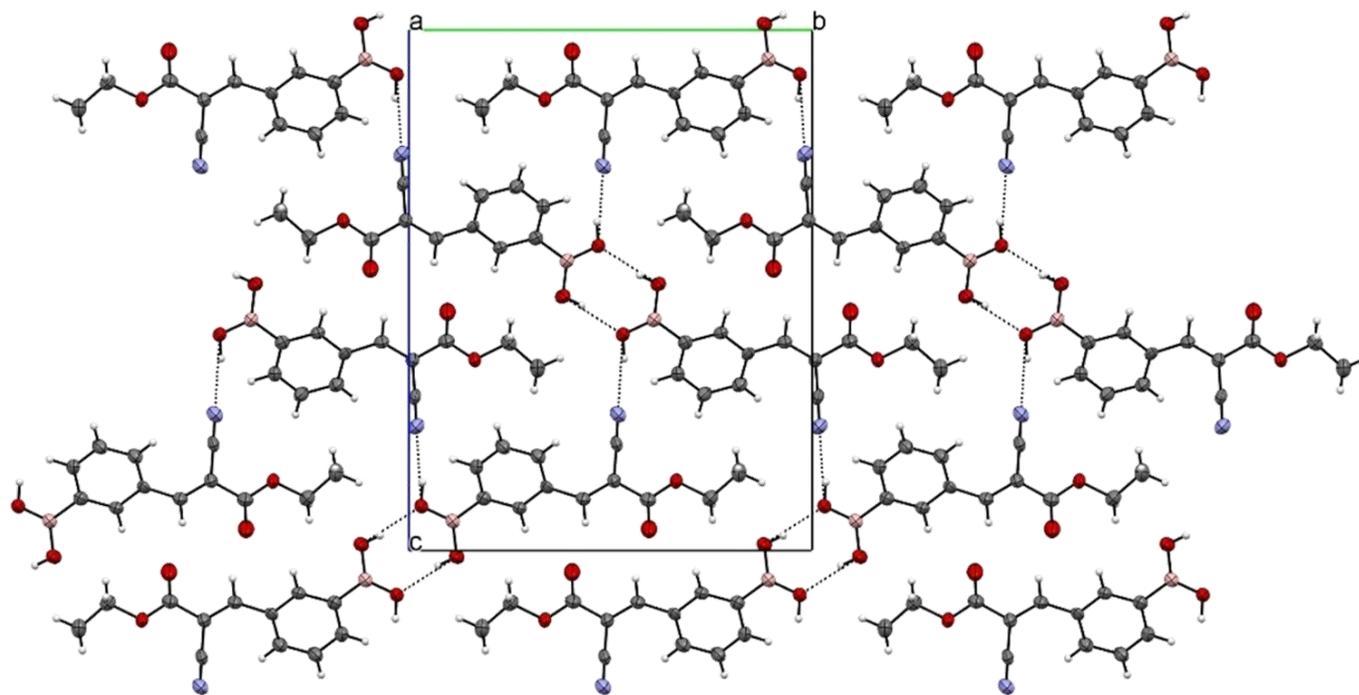


Figura 119 – Difração de raio-x para cristal do composto **65d**

6.5. Avaliação biológica e *in silico*

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Toxoplasmose e outras Protozooses da FIOCRUZ. Os estudos de quimiogenômica e *docking* molecular focados em proteínas quinases foram realizados no Núcleo de Pesquisas em Ecologia e Desenvolvimento Social (NUPEM) na UFRJ. Os estudos *in silico* focados no P2X7R foram realizados no Laboratório do Dr. Murilo Bello na UFRJ.

6.5.1. Cultura de células

6.5.1.1. Macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais de camundongos foram colhidos de camundongos Swiss Webster machos através do lavado da cavidade peritoneal com 3 mL de meio RPMI-1640. As células isoladas foram centrifugadas e ressuspensas.

A contagem de células foi feita na câmara de Neubauer. Alíquotas (0,5 mL) da suspensão de células foram adicionadas aos poços da microplaca de 96 poços e colocadas durante 1 h em uma atmosfera úmida (37 °C, 5% de CO₂) para a adesão celular. As células não aderentes foram removidas por lavagem com meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal de bovino (FBS) e gentamicina (1 µL/mL). Células aderidas com firmeza foram ressuspensas em meio RPMI e usadas para procedimentos experimentais subsequentes.

Os animais utilizados para todos os protocolos foram camundongos da linhagem Swiss Webster, machos saudáveis com cerca de 4 semanas (CEUA L039/2016).

6.5.1.2. Cultura dos protozoários

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram obtidas após inoculação de 2×10^5 parasitas em camundongos Swiss-Webster, adultos, fêmeas por via intraperitoneal. Esta metodologia foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – Fiocruz) sob o número de licença L015/18. Após o pico da parasitemia, os

animais foram eutanasiados por superdosagem de anestésico para obtenção do sangue, através de punção cardíaca, com a forma infectante do protozoário. Além disso, os parasitos obtidos foram isolados em meio Novy-MacNeil-Nicolle (NNN), e mantidos a 28°C durante 7 dias, para obtenção das formas epimastigotas que foram mantidas em meio Liver Infusion Tryptose (LIT) através de passagens semanais durante no máximo 6 passagens.

6.5.2. Avaliação da citotoxicidade em células de mamíferos

6.5.2.1. Ensaio de viabilidade celular pela técnica da redução da resazurina

Para avaliação do metabolismo celular, foi realizado ensaio colorimétrico de redução do corante resazurina. Brevemente, 20 µL (0,15 mg/mL) foram adicionados em cada poço na ausência de luz e as placas foram levadas à estufa por um período de 4-6 h. Como controle negativo, foram mantidos poços somente com células sem tratamento algum e como controle positivo, foi utilizado TritonX-100 a 0,5% (macrófagos e epimastigotas) e 10 µg/mL de benzonidazol (epimastigotas). A leitura foi feita em espectrofotômetro com o comprimento de onda de excitação de 570 nm e emissão 595 nm, utilizando o software Softmax pro (versão 5.1). A análise estatística dos dados foi feita no GraphPad Prism 5.

6.5.2.2. Ensaio de toxicidade celular *in vitro* por meio da técnica de liberação da Lactato Desidrogenase (LDH)

A presença de LDH no meio foi detectada neste experimento utilizando um kit de detecção de citotoxicidade (kit Sigma para LDH) seguindo as instruções do fabricante. Os sobrenadantes celulares (5×10^5 células) foram incubados em uma placa de 96 poços com meio DMEM sem fenol red. Foram testados para LDH que reduz o NAD⁺, que então, converte um corante de tetrazólio (MTT) em um derivado de formazano colorido e solúvel.

6.5.3. Ensaio de permeabilização celular com corantes

6.5.3.1. Captação de iodeto de propídeo (PI)

Os ensaios de captação de corante fluorescente foram realizados com macrófagos peritoneais utilizando um citômetro de fluxo e o intercalante de DNA iodeto de propídeo (PI). As análises foram realizadas no software Summit (BeckmanCoulter). As células retiradas do lavado peritoneal foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado e, em seguida, foi feita a contagem das células na câmera de Neubauer. A quantidade de células por tubo é de 2×10^5 . Incubaram-se os antagonistas, BBG ou o A740003, em concentrações variando de 1nM- 500 μ M, e a série NO em concentrações 0,01 nM- 10 μ M 10 min antes de iniciar o experimento. O processo foi realizado em um banho Maria a 37 °C. O ATP foi adicionado em uma concentração de 5 mM, depois da incubação com os antagonistas e com a série NO por 25 min e o PI (0,05 mM) nos 5 minutos finais da incubação com ATP. O Triton 0,5% foi adicionado nos seus devidos poços, nos 5 min finais da incubação antes do PI. Ao término da incubação realizou-se a leitura no FACS Calibur.

6.5.3.2. Captação de brometo de etídeo

Epimastigotas foram semeadas em placas de 96 poços (pretas de fundo preto), numa concentração de 2×10^6 / mL, juntamente com as amostras em 3 concentrações, em triplicata. As placas foram incubadas em estufa BOD a 28 °C por 72 h. Como controle positivo foram mantidos poços com 10 μ g/mL de benzonidazol e com Triton TX-100 a 0,5%. Como controle negativo foram mantidos poços com parasito e DMSO a 0,5%. Após esse período, brometo de etídeo foi adicionado a cada poço numa concentração de 2,5 μ M. A leitura foi feita em espectrofotômetro utilizando comprimentos de onda de excitação de 520 nm e emissão de 600 nm.

6.5.4. Determinação de ação tripanocida

A partir de uma cultura de *T. cruzi* com 24 h de incubação em meio LIT, foram adicionadas em uma placa de 96 poços 1×10^6 células/200 μ L para todos os poços. Em seguida, adicionou-se 1 μ M da série NO, DMSO ou o benzonidazol por 24 e 72 h. Os parasitas vivos foram contados em uma câmara de Neubauer. Pelo menos três ensaios foram realizados para cada substância e para cada dose. O EC₅₀ foi determinado pelo programa Prisma GraphPad 5.0.

6.5.5. Ensaio ELISA para detecção de IL-1 β

Detecção de IL-1 β nos sobrenadantes de macrófagos diferenciados por PMA (1 μ M) e primados com LPS (100 ng/mL) previamente incubadas por 1 h na presença ou ausência do fármaco. Posterior a esta incubação o ATP foi adicionado nos 30 min finais de incubação até completar as 4 h de tratamento do LPS. Em seguida, o sobrenadante recolhido dos tratamentos foi revelado seguindo as instruções do fabricante do kit ELISA para detecção de IL-1 β (eBioscience, San Diego, CA, USA).

6.5.6. Ensaio *in vitro* de farmacocinética e biodisponibilidade

6.5.6.1. Cultura de células Caco-2 e tratamento

A cultura das células Caco-2 (linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano) foi similar ao descrito por Faria e colaboradores em 2018²⁹⁷. As soluções das borono-tirfostinas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)**, do propranolol e da vimblastina foram preparadas com tampão de permeabilidade em uma concentração de 100 μ M e 0,5% (v/v) de DMSO. As soluções foram tamponadas em pH 7,4 ou 6,5. Após incubação das células Caco-2 por 30 min, 0,3 mL do tampão foi retirado dos poços apicais, sendo substituído com as soluções contendo as borono-tirfostinas por 60 min. A concentração de LY (Lucifer Yellow) contida nos poços doadores e receptores foi medida através de um leitor de

microplacas M5 em um comprimento de onda de excitação de 485 nm e um comprimento de onda de emissão de 530 nm.

6.5.6.2. Teste de solubilidade dependente de pH

A solubilidade dos compostos **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** foi avaliada na faixa de concentração 1-250 μM utilizando-se 5 μL de DMSO em 995 μL de tampão (pH 2,0 = ácido hidrocloreídrico; pH 4,0 = 100 mM de tampão de citrato; pH 7,4 = 100 mM de tampão de fosfato; pH 10,0 = hidróxido de sódio). Essa solução foi distribuída em uma placa de 96 poços na temperatura ambiente por duas horas. Os padrões de calibração foram preparados utilizando-se 5 μL de DMSO em 995 μL de uma mistura de acetonitrila/tampão (1:1). Após a centrifugação (10.000 rpm; 20 min; 25 °C), as amostras foram diluídas em acetonitrila 1:1.

6.5.6.3. Avaliação da estabilidade microsomal de fígado

Microssomas de fígado de camundongo e de humano (0,5 mg/mL em 0,1 M tampão de fosfato em pH 7.4), as borono-tirfostinas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** (1 μM) e DMSO (0,5 μM) foram pré-incubados a 37 °C antes da adição de 1 mM de NADPH para iniciar a reação, totalizando um volume de incubação de 50 μL . Um tampão contendo 0,1 M de fosfato com pH =7,4 foi usado com controle negativo. Os compostos Diazepam e Verapamil foram usados como controle positivo para os microssomas de humano e camundongo, respectivamente. Os fármacos foram incubados por 0, 5, 15, 30 e 45 min com os microssomas, o controle negativo, menos o NADPH, foi incubado por 45 min. A adição de 50 μL de metanol foi utilizada para parar a reação nos tempos apropriados. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (1640xg por 20 min à 4 °C) para precipitar as proteínas. O *clearance* intrínseco (CL_{int}) microsomal para os compostos **65a** e **65c** foi calculado através das instruções dadas pelo Biosystem.²⁹⁷

6.5.7. Experimentos *in silico*

6.5.7.1. Ensaio das propriedades ADMET

O perfil farmacocinético e toxicológico dos derivados foi avaliado utilizando o programa ADMET Predictor® (Simulation Plus).

6.5.7.2. *Docking* molecular

O programa Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0 (CLC Bio, 8200, Aarhus, Dinamarca) foi utilizado para realizar o acoplamento molecular.²⁹⁸ O algoritmo de pontuação MolDock [GRID] com uma resolução de grade de 0,30 Å e o algoritmo de busca MolDock Simplex Evolution foram aplicados nas execuções. As cargas parciais do átomo foram atribuídas de acordo com o esquema de cargas MVD. As interações eletrostáticas internas (ES), a ligação interna de hidrogênio (HBond) e as torções de Sp²-Sp² foram consideradas na avaliação dos ligantes. Cada encaixe molecular foi realizado durante 200 execuções. Os modos de ligação de poses dos ligantes foram selecionados com base na melhor pontuação de *rerank*. O espaço de busca do raio de 15 Å foi inserido ao redor da área a ser analisada no receptor P2X7. As moléculas ligantes foram encaixadas no local de ligação do ATP conhecido.

6.5.8. Análise do edema de pata *in vivo*

Modelo de edema de pata/animais e grupo controle: no ensaio de edema de pata foram utilizados camundongos (Swiss Webster) machos, pesando em média 30 g, tratados com ração balanceada PURINA-LABINA, água, *ad libitum*, e ciclo claro-escuro de 12 h. A realização destes ensaios está de acordo com CEUA-FIOCRUZ com o número de licença LW-58/14. Modelo de edema de pata induzido pelo ATP extracelular: os camundongos receberam injeção subplantar em uma das patas posteriores de ATP (10 mM/pata) no volume de 20 µL. A aplicação de solução de NaCl 0,9% foi feita na pata contralateral. Anterior aos 60 min da aplicação do agente flogístico foram realizados os

tratamentos: controle NaCl 0,9% intraperitoneal, Diclofenaco 10 mg/Kg/intraperitoneal, ATPox 10mg/Kg/intraperitoneal e, dos compostos antagonistas **65a (NO-01)** e **65c (NO-12)** em diferentes concentrações (1 - 0,001 mg/Kg). Decorridos 60 min de pré-incubação com os antagonistas e 60 min após a aplicação do ATP, foi realizada a leitura do volume das patas com auxílio do aparelho pletismômetro (UGO-BASILE).

7. REFERÊNCIAS

- 1- Medzhitov, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell* 2010, 140, 771-776.
- 2- Nathan, C.; Ding, A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010, 140, 871-882.
- 3- Prescott, S. M.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A. Events at the vascular wall: the molecular basis of inflammation. *J. Invest. Med.* 2001, 49, 104-111.
- 4- Cruvinel, W. M.; Mesquita Jr., D.; Araújo, J. A. P.; Catelan, T. T. T.; de Souza, A. W. S.; da Silva, N. P.; Andrade, L. E. C. Sistema imunitário - parte I fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Rev. Bras. Reumatol.* 2010, 50, 434-461.
- 5- Sugimoto, M. A.; Vago, J. P.; Perretti, M.; Teixeira, M. M. Mediators of the resolution of the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2019, 40, 212-227.
- 6- Aira, S.; Hemmi, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* 2003, 85, 85-95.
- 7- Barton, G. M.; Kagan, J. C. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.* 2009, 9, 535-542.
- 8- Chen, G. Y.; Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10, 826-837.
- 9- Abdulkhaleq, L. A.; Assi, M. A.; Abdullah, R.; Zamri-Saad, M.; Taufiq-Yap, Y. H.; Hezmee, M. N. M. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet. World.* 2018, 11, 627-635.
- 10- Attiq, A.; Jalil, J.; Husain, K.; Ahmad, W. Raging the war against inflammation with natural products. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 1-27.
- 11- a) Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001, 294, 1871-1875; b) Nakanishi, M.; Rosenberg D. W. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and câncer. *Semin. Immunopathol.* 2013, 35, 123-137.
- 12- a) Kawabe, J.; Ushikubi, F.; Hasebe, N. Prostacyclin in vascular diseases. *Circ. J.* 2010, 74, 836-843; b) Stitham, J.; Midgett, C.; Martin, K. A.; Hwa, J. Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Front. Pharmacol.* 2011, 2, 1-8.
- 13- a) Joo, M.; Sadikot, R. T. PGD synthase and PGD2 in immune response. *Mediators of Inflammation* 2012, 2012, 1-6; b) Sandig, H.; Pease, J. E.; Sabroe, I. Contrary prostaglandins: the opposing roles of PGD2 and its metabolites in leukocyte function. *J. Leukocyte Biol.* 2007, 81, 372-382.
- 14- Xu, C.; Liu, W.; You, X.; Leimert, K.; Popowycz, K.; Fang, X.; Wood, S. L.; Slater, D. M.; Sun, Q.; Gu, H.; Olson, D. M.; Ni, X. PGF2a modulates the output of chemokines and pro-inflammatory cytokines in myometrial cells from term pregnant women through divergent signaling pathways. *Mol. Hum. Reprod.* 2015, 21, 603-614.
- 15- Pairet, M.; Engelhardt, G. Distinct isoforms (COX-1 and COX-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 1996, 10, 1-15.

- 16- Fitzpatrick, F.A. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr. Pharm. Des.* 2004, 10, 577-588.
- 17- Ricciotti, E.; FitzGerald, G. A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011, 31, 986-1000.
- 18- a) Anti, S. M. A.; Giorgi, R. D. N.; Chahade, W. H. Anti-inflamatórios hormonais: glicocorticóides. *einstein* 2008, 6, 159-165; b) Sostres, C.; Gargallo, C. J.; Arroyo, M. T.; Lanás, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2010, 24, 121-132; c) Dubreuil, M.; Louie-Gao, Q.; Peloquin, C. E.; Choi, H. K.; Zhang, Y.; Neogi, T. Risk of myocardial infarction with use of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs in patients with spondyloarthritis and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2018, 0, 1-6; d) Hariforoosh, S.; Asghar, W.; Jamali, F. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013, 16, 821-47.
- 19- Vane, J. R. The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. *J. Physiol. Pharmacol.* 200, 51, 573-586.
- 20- Ferreira, S. H.; Moncada, S.; Vane, J. R. Indomethacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. *Nature New Biol.* 1971, 231, 237-239.
- 21- a) Spinosa, H. S.; Gorniak, S. L.; Beranrdi, M. M. Farmacologia aplicada à medicina veterinária. 2ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 646, 1999; b) Alencar, M. M. A.; Rocha, M. F. G.; Pinheiro, D. C. S. N. Inflamação e sua modulação por anti-inflamatórios não esteroides: riscos e benefícios. *Ciência Animal*, 2005, 15, 33-41.
- 22- Süleyman, H.; Demircan, B.; Karagöz, Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.* 2007, 59, 247-258.
- 23- a) Mukherjee, D.; Nissen, S. E.; Topol, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 2001, 286, 954-959; b) Solomon, S. D.; McMurray, J. J.; Pfeffer, M. A.; Wittes, J.; Fowler, R.; Finn, P.; Anderson, W. F.; Zauber, A.; Hawk, E.; Bertagnolli, M. Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 1071-1080.
- 24- Sibbald, B. Rofecoxib (Vioxx) voluntarily withdrawn from market. *CMAJ* 2004, 171, 1027-1028.
- 25- a) Beato, M.; Klug, J. Steroid hormone receptors: an update. *Hum. Reprod. Update* 2000, 6, 225-236; b) Schmid, W.; Cole, T. J.; Blendy, J. A.; Schutz, G. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signalling in development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1995, 53, 33-35; c) Ables, E. T.; Drummond-Barbosa, D. Steroid hormones and the physiological regulation of tissue resident stem cells: lessons from the drosophila ovary. *Curr. Stem. Cell Rep.* 2017, 3, 9-18.
- 26- Vandevyver, S.; Dejager, L.; Tuckermann, J.; Libert, C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 2013, 154, 993-1007.
- 27- Ericson-Neilsen, W.; Kaye, A. D. Steroids: pharmacology, complications, and practice delivery issues. *Steroids.* 2014, 14, 203-207.

- 28- Rhen, T.; Cidlowski, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353, 1711-1723.
- 29- Liberman, A. C.; Druker, J.; Perone, M. J.; Arzt, E. Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 18, 45-56.
- 30- Schäcke, H.; Döcke, W. -D.; Asadullah, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther.* 2002, 96, 23-43.
- 31- Barnes, P. J.; Adcock, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 2009, 373, 1905-1917.
- 32- Moghadam-Kia, S.; Werth, V. P. Prevention and treatment of systemic glucocorticoid side effects. *Int. J. Dermatol.* 2010,49, 239-248.
- 33- Turner, M. D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D. J. Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* 2014, 1843, 2563-2582.
- 34- Kozak, W.; Kluger, M. J.; Soszynski, D.; Conn, C. A.; Rudolph, K.; Leon, L. R.; Zheng, H. IL-6 and IL-1 β in fever: studies using cytokine-deficient (knockout) mice. *A. N. Y. Acad. Sci.* 1998, 856, 33-47.
- 35- Pugazhenthii, S.; Zhang, Y.; Bouchard, R.; Mahaffey, G. Induction of an inflammatory loop by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α involves NF- κ B and STAT-1 in differentiated human neuroprogenitor cells. *PLOS one* 2013, 8, 1-12.
- 36- Ben-Sasson, S. Z.; Hu-Li, J.; Quiel, J.; Cauchetaux, S.; Ratner, M.; Shapira, I.; Dinarello, C. A.; Paula, W. E. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen driven expansion and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106, 7119-7124.
- 37- Dinarello, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011, 117, 3720-3732.
- 38- Lane, T.; Lachmann, H. J. The emerging role of interleukin-1 β in autoinflammatory diseases. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2011, 11, 361-368.
- 39- Wen, H.; Ting, J. P.; O'Neill, L. A. A role for the NLRP3 inflammasome in metabolic diseases-did Warburg miss inflammation? *Nat. Immunol.* 2012, 13, 352-357.
- 40- Yang, Y.; Wang, H.; Kouadir, M.; Song, H.; Shi, F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death Dis.* 2019, 10, 1-11.
- 41- Du, R. -H.; Lu, M.; Wang, C.; Ding, J. -H.; Wu, G.; Hu, G. The pore-forming subunit Kir6.1 of the K-ATP channel negatively regulates the NLRP3 inflammasome to control insulin resistance by interacting with NLRP3. *Exp. Mol. Med.* 2019, 51, 1-13.
- 42- a) Beamer, E.; Göllöncsér, F.; Horváth, G.; Bekö, K.; Otrókocsi, L.; Koványi, B.; Sperlágh, B. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: an update from molecules to behavior. *Neuropharmacol.* 2016, 104, 94-104; b) Rech, J. C.; Bhattacharya, A.; Letavic, M. A.; Savall, B. M. The evolution of P2X7 antagonists with a focus on CNS indications. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016 26, 3838-3845; c) Gentile, D.; Natale, M.; Lazzarini, P. E.; Capecchi, P. L.; Laghi-Pasini, F. The role of P2X7 receptors in tissue fibrosis: a brief review. *Purinergic Signal* 2015, 11, 435-440; d) Baudalet, D.; Lipka, E.; Millet, R.; Ghinet, A.

Involvement of the P2X7 purinergic receptor in inflammation: an update of antagonists series since 2009 and their promising therapeutic potential. *Curr. Med. Chem.* 2015, 22, 713-729.

43- Chen, L.; Deng, H.; Cui, H.; Fang, J.; Zuo, Z.; Deng, J.; Li, Y.; Wang, X.; Zhao, L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 2018, 9, 7204-7218.

44- Page, T. H.; Smolinska, M.; Gillespie, J.; Urbaniak, A. M.; Foxwell, B. M. J. Tyrosine kinases and inflammatory signalling. *Curr. Mol. Med.* 2009, 9, 69-85.

45- O'Shea, J. J.; Schwartz, D. M.; Villarino, A. V.; Gadina, M.; McInnes, I. B.; Laurence, A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annu. Rev. Med.* 2015, 66, 311-328.

46- Tang, C. -H.; Lu, D. -Y.; Yang, R. -S.; Tsai, H. -Y.; Kao, M. -C.; Fu, W. -M.; Chen, Y. -F. Leptin-induced IL-6 production is mediated by leptin receptor, insulin receptor substrate-1, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, NF- κ B, and p300 pathway in microglia. *J. Immunol.* 2007, 179, 1292-1302.

47- Novogrodsky, A.; Vanichkin, A.; Patya, M.; Gazit, A.; Osherov, N.; Levitzki, A. Prevention of lipopolysaccharide-induced lethal toxicity by tyrosine kinase inhibitors. *Science* 1994, 264, 1319-1322.

48- a) Bissonnette, R.; Papp, K. A.; Poulin, Y.; Gooderham, M.; Raman, M.; Mallbris, L.; Wang, C.; Purohit, V.; Mamolo, C.; Papacharalambous, J.; Ports, W. C. Topical tofacitinib for atopic dermatitis: a phase IIa randomized trial. *Br. J. Dermatol.* 2016, 175, 902-911; b) Mirshafiey, A.; Ghalamfarsa, G.; Asghari, B.; Azizi, G. Receptor tyrosine kinase and tyrosine kinase inhibitors. *Innov. Clin. Neurosci.* 2014, 11, 23-36.

49- a) Kolb, H.; Mandrup-Poulsen, T. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 2010, 53, 10-20; b) Kinney, J. W.; Bemiller, S. M.; Murtishaw, A. S.; Leisgang, A. M.; Salazar, A. M.; Lamb, B. T. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2018, 4, 575-590; c) Newcombe, E. A.; Camats-Perna, J.; Silva, M. L.; Valmas, N.; Huat, T. J.; Medeiros, R. Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 2018, 15, 276-302; d) Rahmoune, H.; Harris, L. W.; Guest, P. C.; Bahn, S. Explorando o componente inflamatório da esquizofrenia. *Rev. Psiqu. Clín.* 2013, 40, 28-34; e) da Motta, N. A. V.; Fumian, M. M.; de Castro, J. P.; de Brito, F. C. F. Inflamação e aterosclerose: novos biomarcadores e perspectivas terapêuticas. *Rev. Bras. Cardiol.* 2013, 26, 390-399; f) Grabiec, A. M.; Hussell, T. The role of airway macrophages in apoptotic cell clearance following acute and chronic lung inflammation. *Semin. Immunopathol.* 2016, 38, 409-423; g) El-Gabalawy, H.; Guenther, L. C.; Bernstein, C. N. Epidemiology of immune-mediated inflammatory diseases: incidence, prevalence, natural history, and comorbidities. *J. Rheumatol.* 2010, 85, 2-10.

50- a) Kelly, F. J.; Fussell, J. C. Linking ambient particulate matter pollution effects with oxidative biology and immune responses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015, 1340, 84-94; b) Tuet, W. Y.; Chen, Y.; Fok, S.; Champion, J. A.; Ng, N. L. Inflammatory responses to secondary organic aerosols (SOA) generated from biogenic and anthropogenic precursors. *Atmos. Chem. Phys.* 2017, 17, 11423-11440; c) Kurt, O. K.; Zhang, J.; Pinkerton, K. E. Pulmonary health effects of air pollution. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 2016, 22, 138-142; d)

Molodecky, N. A.; Kaplan, G. G. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol. Hepatol.* 2010, 6, 339-346.

51- Colaboradores GBD. Disease and injury incidence and prevalence collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017. *Lancet* 2018, 392, 1789-1858.

52- Yang, Y. C.; McClintock, M. K.; Kozloski, M.; Li, T. Social isolation and adult mortality: the role of chronic inflammation and sex differences. *J. Health Soc. Behav.* 2013, 54, 183-203.

53- a) Robinson Jr., D.; Hackett, M.; Wong, J.; Kimball, A. B.; Cohen, R.; Bala, M. IMID Study Group. Co-occurrence and comorbidities in patients with immune-mediated inflammatory disorders: an exploration using US healthcare claims data, 2001-2002. *Curr. Med. Res. Opin.* 2006, 22, 989-1000; b) Cohen, R.; Robinson Jr., D.; Paramore, C.; Fraeman, K.; Renahan, K.; Bala, M. Autoimmune disease concomitance among inflammatory bowel disease patients in the United States, 2001-2002. *Inflamm. Bowel Dis.* 2008, 14, 738-43; c) Maradit-Kremers, H.; Nicola, P. J.; Crowson, C. S.; Ballman, K. V.; Gabriel, S. E. Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis Rheum.* 2005, 52, 722-32; d) Smitten, A. L.; Simon, T. A.; Hochberg, M. C.; Suissa, S. A meta-analysis of the incidence of malignancy in adult patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2008, 10, 232-240; e) Argollo, M.; Gilardi, D.; Peyrin-Biroulet, C.; Chabot, J. -F.; Peyrin-Biroulet, L.; Danese, S. Comorbidities in inflammatory bowel disease: a call for action. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2019, 4, 643-654; f) Takeshita, J.; Grewal, S.; Langan, S. M.; Mehta, N. N.; Ogdie, A.; Van Voorhees, A. S.; Gelfand, J. M. Psoriasis and comorbid diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2017, 76, 377-390.

54- a) Eaden, J. A.; Abrams, K. R.; Mayberry, J. F. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001, 48, 526-535; b) Terzic, J.; Grivennikov, S.; Karin, E.; Karin, M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology.* 2010, 138, 2101-2114.

55- WHO- World Health Organization. Câncer. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>. Acessado em: 6 de Dez de 2019.

56- INCA- Instituto Nacional de Câncer. Incidência de câncer no Brasil, Estimativa 2018. Disponível em: http://www.oncoguia.org.br/pub/material_apoio/material_apoio_4f42_180205_2830.pdf. Acessado em: 6 de Dez de 2019.

57- INCA- Instituto Nacional de Câncer. Sistema de informação sobre mortalidade. Disponível em: https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/cons_ultar.xhtml#panelResultado. Acessado em: 6 de Dez de 2019.

58- a) Chatterjee, A.; Rodgera, E. J.; Eccles, M. R. Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2018, 51, 149-159; b) Cooper, G. M. The cell: a molecular approach. 2ª ed., Sinauer Associates, Sunderland, cap. 15, 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>. Acessado em: 30 de Jan de 2020.

- 59- a) Blackadar, C. B. Historical review of the causes of cancer. *World J. Clin. Oncol.* 2016, 7, 54-86; b) Parsa, N. Environmental factors inducing human cancers. *Iranian J. Publ. Health* 2012, 41, 1-9.
- 60- Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. *J. Cancer Res. Pract.* 2017, 4, 127-129.
- 61- Chial, H. Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 2008, 1, 33.
- 62- Karavasilis, V.; Reid, A.; Sinha, R.; de Bono, J. S. Cancer drug design and discovery - cancer drug resistance. Elsevier Inc., cap. 17, pp. 410-411, 2008.
- 63- Weinstein, I. B.; Joe, A. K. Mechanisms of disease: oncogene addiction-a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2006, 3, 448-457.
- 64- a) Grandér, D. How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer? *Medical Oncol.* 1998, 15, 20-26. b) Guo, X. E.; Ngo, B.; Modrek, A. S.; Lee, W. -H. Targeting tumor suppressor networks for cancer therapeutics. *Curr. Drug Targets* 2014, 15, 2-16.
- 65- Wang, L. -H.; Wu, C. -F.; Rajasekaran, N.; Shin, Y. K. Loss of tumor suppressor gene function in human cancer: an overview. *Cell Physiol. Biochem.* 2018, 51, 2647-2693.
- 66- Ramos-Nino, M. E. The Role of chronic inflammation in obesity-associated cancers. *ISRN Oncol.* 2013, 2013, 1-25.
- 67- Nickoloff, B. J.; Ben-Neriah, Y.; Pikarsky, E. Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? *J. Invest. Dermatol.* 2005, 124, 10-14.
- 68- Grivennikov, S. I.; Greten, F. R.; Karin, M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010, 140, 883-899.
- 69- Hussain, S. P.; Harris, C. C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int. J. Cancer* 2007, 121, 2373-2380.
- 70- Greten, F. R.; Grivennikov, S. I. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. *Immunity* 2019, 51, 27-41.
- 71- a) Raz, Y.; Erez, N. An inflammatory vicious cycle: fibroblasts and immune cell recruitment in cancer. *Exp. Cell Res.* 2013, 319, 1596-1603; b) Witz, I. P. Yin-Yang activities and vicious cycles in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2008, 68, 9-13.
- 72- Todoric, J.; Antonucci, L.; Karin, M. Targeting inflammation in cancer prevention and therapy. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. 2016, 9, 895-905.
- 73- a) Di Virgilio, F.; Adinolf, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene* 2017, 36, 293-303; b) Adinolfi, E.; De Marchi, E.; Orioli, E.; Pegoraro, A.; Di Virgilio, F. Role of the P2X7 receptor in tumor-associated inflammation. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2019, 47, 59-64; c) Adinolfi, E.; Raffaghello, L.; Giuliani, A. L.; Cavazzini, L.; Capece, M.; Chiozzi, P.; Bianchi, G.; Kroemer, G.; Pistoia, V.; Di Virgilio, F. Expression of P2X7 receptor increases *in vivo* tumor growth. *Cancer Res.* 2012, 72, 2957-2969.
- 74- a) Zhu, C.; Wei, Y.; Wei, X. AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol. Cancer* 2019, 18, 153-175; b) Fueyo, J.;

- Alonso, M. M.; Kerrigan, B. C. P.; Gomez-Manzano, C. Linking inflammation and cancer: the unexpected SYK world. *Neuro-Oncology* 2018, 20, 582-583; c) Del Prete, A.; Allavena, P.; Santoro, G.; Fumarulo, R.; Corsi, M. M.; Mantovani, A. Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochimica Medica* 2011, 21, 264-275; d) Gurule, N. J.; Heasley, L. E. Linking tyrosine kinase inhibitor-mediated inflammation with normal epithelial cell homeostasis and tumor therapeutic responses. *Cancer Drug Resist.* 2018, 1, 118-125.
- 75- Gadelha, M. I. P. A Assistência oncológica e os 30 anos do Sistema Único de Saúde. *Rev. Bras. Cancerol.* 2018, 64, 237-245.
- 76- SAES/Ministério da saúde. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/component/tags/tag/saes>. Acessado em: 6 de Dez de 2019.
- 77- Lidani, K. C. F.; Andrade, F. A.; Bavia, L.; Damasceno, F. S.; Beltrame, M. H.; Messias-Reason, I. J.; Sandri, T. L. Chagas Disease: from discovery to a worldwide health problem. *Front. Public Health* 2019, 7, 1-13.
- 78- Martins-Melo, F. R.; Ramos Jr., A. N.; Alencar, C. H.; Heukelbach, J. Prevalence of Chagas Disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Acta Trop.* 2014, 130, 167-174.
- 79- Conteh, L.; Engels, T.; Molyneux, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet* 2010, 375, 239-247.
- 80- a) Utzinger, J.; Becker, S. L.; Knopp, S.; Blum, J.; Neumayr, A. L.; Keiser, J.; Hatz, C. F. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. *Swiss Med. Wkly.* 2012, 142, 1-24; b) Trouiller, P.; Olliaro, P.; Torreele, E.; Orbinski, J.; Laing, R.; Ford, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet.* 2002, 359, 2188-2194.
- 81- a) Schmunis, G. A.; Yadon, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010, 115, 14-21; b) Faria, R. X.; Gonzaga, D. T. G.; Pacheco, P. A. F.; Souza, A. L. A.; Ferreira, V. F.; da Silva, F. C. Searching for new drugs for Chagas Diseases: triazole analogs display high in vitro activity against *Trypanosoma cruzi* and low toxicity toward mammalian cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2018, 50, 81-91.
- 82- Lee, B. Y.; Bacon, K. M.; Bottazzi, M. E.; Hotez, P. J. Global economic burden of Chagas Disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis.* 2013, 13, 3423-48.
- 83- Simões, M. V.; Romano, M. M. D.; Schmidt, A.; Martins, K. S. M.; Marin-Neto, J. A. Cardiomiopatia da Doença de Chagas. *Int. J. Cardiovasc. Sci.* 2018, 31, 173-189.
- 84- Rassi Jr., A.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas Disease. *Lancet.* 2010, 375, 1388-1402.
- 85- a) Teixeira, A. R. L.; Nascimento, R. J.; Sturm, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006, 101, 463-491; b) Faria, R. X.; Souza, A. L. A.; Lima, B.; Tietbohl, L. A. C.; Fernandes, C. P.; Amaral, R. R.; Ruppelt, B.M.; Santos, M. G.; Rocha, L. Plants of Brazilian restingas with tripanocide activity against *Trypanosoma cruzi* strains. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2017, 49, 473-483.
- 86- Bonney, K. M.; Luthringer, D. J.; Kim, S. A.; Garg, N. J.; Engman, D. M. Pathology and pathogenesis of Chagas heart Disease. *Annu. Ver. Pathol.* 2018, 14, 421-447.

- 87- DNDI- What is Chagas Diseases? Disponível em: <https://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>. Acessado em: 9 de Dez de 2019.
- 88- PAHO-Chagas Disease. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=en. Acessado em: 9 de Dez de 2019.
- 89- Fiocruz-Doença de Chagas. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7a-de-chagas>. Acessado em: 9 de Dez de 2019.
- 90- Ministério da saúde - Doença de Chagas: o que é, causas, sintomas, tratamento e prevenção. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas>. Acessado em: 9 de Dez de 2019.
- 91- Forsyth, C. J.; Granados, P. S.; Pacheco, G. J.; Betancourt, J. A.; Meymandi, S. K. Current gaps and needs for increasing access to healthcare for people with Chagas Disease in the USA. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2019, 6, 13-22.
- 92- a) Dias, J. C. P. Doença de Chagas: sucessos e desafios. *Cad. Saúde Pública* 2006, 22, 2020-2021; b) Silveira A. C. Os novos desafios e perspectivas futuras do controle. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2011, 44, 122-124.
- 93- de Noya, B. A.; Díaz-Bello, Z.; Colmenares, C.; Ruiz-Guevara, R.; Mauriello, L.; Zavala-Jaspe, R.; Suarez, J. A.; Abate, T.; Naranjo, L.; Paiva, M.; Rivas, L.; Castro, J.; Márques, J.; Mendoza, I.; Acquatella, H.; Torres, J.; Noya, O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas Disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infect. Dis.* 2010, 201, 1308-1315.
- 94- Herwaldt, B. L. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin. Microbiol Ver.* 2001, 14, 659-688.
- 95- Brener, Z.; Gazzinelli, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' Disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997, 114, 103-110.
- 96- Teixeira, M. M.; Gazzinelli, R. T.; Silva, J. S. Inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.* 2002, 18, 262-265.
- 97- Poncini, C. V.; Soto, C. D. A.; Batalla, E.; Solana, M. E.; Cappa, S. M. G. *Trypanosoma cruzi* induces regulatory dendritic cells *in vitro*. *Infect. Immun.* 2008, 76, 2633-2641.
- 98- a) Bogdan, C.; Rölinghoff, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today.* 1999, 15, 22-28; b) Cardoso, M. S.; Reis-Cunha, J. L.; Bartholomeu D. C. Evasion of the immune response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* 2015, 6, 1-15.
- 99- a) Silva, J. S.; Twardzik, D. R.; Reed, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor α (TGF- β). *J. Exp. Med.* 1991, 174, 539-545; b) Silva, T. A.; Ferreira, L. P. C.; Pereira, M. C. S.; Calvet, C. M. Differential Role of TGF- β in extracellular matrix regulation during *Trypanosoma cruzi*-Host cell interaction. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 1-22; c) Souza, P. E. A.; Rocha, M. O. C.; Menezes, C. A. S.; Coelho, J. S.; Chaves, A. C. L.; Gollob, K. J.; Dutra, W. O. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and t cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' Disease. *Infect. Immun.* 2007, 75, 1886-1894.

- 100- Talvani, A.; Teixeira, M. M. Inflammation and Chagas Disease some mechanisms and relevance. *Adv. Parasitol.* 2011, 76, 171-194.
- 101- Kölliker-Frers, R. A.; Otero-Losada, M.; Razzitte, G.; Calvo, M.; Carbajales, J.; Capani, F. Chagas cardiomyopathy: role of sustained host- parasite interaction in systemic inflammatory burden in Chagas Disease - basic investigations and challenges. (Eds. Nissapatorn, V.; Oz, H. S.), IntechOpen, London, cap. 7, 2018.
- 102- dos Reis, G. A. Doença de Chagas: manual para experimentação animal. (Eds. Araújo-Jorge, T. C.; de Castro, S. L.), Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, cap. 4, pp 48-49, 2000.
- 103- Morilla, M. J.; Romero, E. D. Nanomedicines against Chagas Disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine* 2015, 10, 465-481.
- 104- Bermudez, J.; Davies, C.; Simonazzi, A.; Real, J. P.; Palma, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas Disease. *Acta Trop.* 2016, 156, 1-16.
- 105- Azambuja, P.; Garcia, E. S. Portal da doença de chagas - ciclo evolutivo. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/ciclo-evolutivo/>. Acessado em: 11 de Dez de 2019.
- 106- Bern, C. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 2015, 373, 456-466.
- 107- Salassaa, B. N.; Romano, P. S. Autophagy: a necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence* 2018, 10, 460-469.
- 108- de Souza, W.; de Carvalho, T. M. U.; Barrias, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *I. J. Cell Biol.* 2010, 2010, 1-18.
- 109- Tyler, K. M.; Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.* 2001, 31, 472-481.
- 110- Andrade, L. O.; Andrews, N. W. The *Trypanosoma cruzi* - host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Ver. Microbiol.* 2005, 3, 819-823.
- 111- Maeda, F. Y.; Cortez, C.; Yoshida, N. Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Front. Immunol.* 2012, 3, 1-7.
- 112- a) Epting, C. L.; Coates, B. M.; Engman, D. M. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 2010, 126, 283-291; b) Clemente, T. M.; Cortez, C.; Novaes, A. S.; Yoshida, N. Surface molecules released by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms downregulate host cell invasion. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016, 10, 1-18.
- 113- a) Melo-Jorge, M.; Perrin, M P. The Chagas' Disease parasite *Trypanosoma cruzi* exploits nerve growth factor receptor TrkA to infect mammalian hosts. *Cell Host Microbe* 2007, 1, 2512-61; b) Vieira, M.; Dutra, J. M. F.; Carvalho, T. M. U.; Silva, N. L. C.; Souto-Pradrón, T.; Souza, W. Cellular signaling during the macrophage invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Histochem. Cell Biol.* 2002, 118, 491-499.
- 114- Yoshida, N.; Favoreto, Jr. S.; Ferreira, T.; Manque, P. M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000, 33, 269-278.

- 115- a) Santos, R. F.; Pôssa, M. A. S.; Bastos, M. S.; Guedes, P. M. M.; Almeida, M. R.; De Marco, R.; Verjovski-Almeida, S.; Bahia, M. T.; Fietto, J. L. R. Influence of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity on *Trypanosoma cruzi* infectivity and virulence. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 2009, 3, 1-11; b) Meyer-Fernandes, J. R.; Cosentino-Gomes, D.; Vieira, D. P.; Lopes, A. H. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activities in trypanosomatids: possible roles in infection, virulence and purine recycling. *Open Parasitol. J.* 2010, 4, 116-119.
- 116- Pacheco, P. A. F.; Dantas, L. P.; Ferreira, L. G. B.; Faria, R. X. Purinergic receptors and neglected tropical diseases: why ignore purinergic signaling in the search for new molecular targets? *J. Bioener. Biomembr.* 2018, 50, 307-313.
- 117- Burnstock, G. Purinergic receptors. *J. Theoretical Biol.* 1976, 62, 491-503.
- 118- a) North, R. A. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 2002, 82, 1013-1067; b) Ferrari, D.; Gambari, R.; Idzko, M.; Müller, T.; Albanesi, C.; Pastore, S.; La Manna, G.; Robson, S. C.; Cronstein, B. Purinergic signaling in scarring. *FASEB J.* 2016, 30, 3-12; c) Burnstock, G. Purinergic signaling in the cardiovascular system. *Circ. Res.* 2017, 120, 2017-228; d) Novak, I. Purinergic receptors in the endocrine and exocrine pancreas. *Purinergic signal* 2008, 4, 237-253.
- 119- a) Varani, K.; Padovan, M.; Govoni, M.; Vincenzi, F.; Trotta, F.; Borea, P. A. The role of adenosine receptors in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* 2010, 10, 61-64; b) Burnstock, G. Therapeutic potential of purinergic signalling for diseases of the urinary tract. *BJU Int.* 2011, 107, 192-204; c) Oliveira-Giacomelli, A.; Naaldijk, Y.; Sardá-Arroyo, L.; Gonçalves, M. C. B.; Corrêa-Velloso, J.; Pillat, M. P.; de Souza, H. D. N.; Ulrich, H. Purinergic receptors in neurological diseases with motor symptoms: targets for therapy. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 1-28; d) Di Virgilio, F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. *Cancer Res.* 2012, 72, 5441-5447.
- 120- Burnstock, G. Purine and purinergic receptors. *Brain Neurosci. Adv.* 2018, 2, 1-10.
- 121- Jarvis, M. F.; Khakh, B. S. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacol* 2009, 56, 208-215.
- 122- Syed, N. I.; Kennedy, C. Pharmacology of P2X receptors. *WIREs Membr. Transp. Signal* 2012, 1, 16-30.
- 123- Kawate, T. P2X receptor activation in protein reviews. (Ed. Atassi, M.), Springer, Singapore, pp. 55-69, 2017.
- 124- Allsopp, R. C.; Evans, R. J. Contribution of the juxtatransmembrane intracellular regions to the time course and permeation of ATP-gated P2X7 receptor ion channels. *J. Biol. Chem.* 2015, 290, 14556-14566.
- 125- a) Costa-Junior, H. M.; Vieira, F. S.; Coutinho-Silva, R. C. Terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signal* 2011, 7, 7-19; b) Sluyter, R. The P2X7 Receptor in protein reviews. (Ed. Atassi, M.), Springer, Singapore, pp. 17-53, 2017.
- 126- a) Yan, Z.; Khadra, A.; Li, S.; Tomic, M.; Sherman, A.; Stojilkovic, S. S. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *J. Neurosci.* 2010, 30, 14213-14224; b) Rassendren, F.; Buell, G. N.; Virginio, C.; Collo, G.; North, R. A.; Surprenant, A. The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* 1997, 272,

- 5482-5486; c) Bradley, H. J.; Browne, L. E.; Yang, W.; Jiang, L. H. Pharmacological properties of the rhesus macaque monkey P2X7 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2011, 164, 743-754.
- 127- Alberto, A. V.; Faria, R. X.; Couto, C. G.; Ferreira, L. G.; Souza, C. A.; Teixeira, P. C.; Fróes, M. M.; Alves, L. A. Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2013, 386, 775-787.
- 128- Faria, R. X.; de Farias, F. P.; Alves, L. A. Are second messengers crucial for opening the pore associated with P2X7 receptor? *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2005, 288, 260-271.
- 129- Sanderson, J.; Dartt, D. A.; Trinkaus-Randall, V.; Pintor, J.; Civan, M. M.; Delamere, N. A.; Fletcher, E. L.; Salt, T. E.; Grosche, A.; Mitchell, C. H. Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Muller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland. *Exp. Eye Res.* 2014, 127, 270-279.
- 130- Agrawal, A.; Gartland, A. P2X7 receptors: role in bone cell formation and function. *J. Mol. Endocrinol.* 2015, 54, R75-R88.
- 131- Young, C. N.; Brutkowski, W.; Lien, C. F.; Arkle, S.; Lochmuller, H.; Zablocki, K.; Gorecki, D. C. P2X7 purinoceptor alterations in dystrophic mdx mouse muscles: relationship to pathology and potential target for treatment. *J. Cell Mol. Med.* 2012, 16, 1026-1037.
- 132- Woods, L. T.; Camden, J. M.; Batek, J. M.; Petris, M. J.; Erb, L.; Weisman, G. A. P2X7 receptor activation induces inflammatory responses in salivary gland epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2012, 303, C790-C801.
- 133- Young, C. N. J.; Chira, N.; Róg, J.; Al-Khalidi, R.; Benard, M.; Galas, L.; Chan, P.; Vaudry, D.; Zablocki, K.; Górecki, D. C. Sustained activation of P2X7 induces MMP-2-evoked cleavage and functional purinoceptor inhibition. *J. Mol. Cell Biol.* 2017, 10, 229-242.
- 134- Burnstock, G.; Boeynaems, J. -M. Purinergic signalling and immune cells. *Purinergic Signal* 2014, 10, 529-564.
- 135- a) Monif, M.; Burnstock, G.; Williams, D. A. Microglia: proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, 42, 1753-1756; b) Leeson, H. C.; Kasherman, M. A.; Chan-Ling, T.; Lovelace, M. D.; Brownlie, J. C.; Toppinen, K. M.; Gu, B. J.; Weible II, M. W. P2X7 receptors regulate phagocytosis and proliferation in adult hippocampal and svz neural progenitor cells: implications for inflammation in neurogenesis. *Stem Cells* 2018, 36, 1764-1777.
- 136- Qiu, Y.; Li, W. H.; Zhang, H. Q.; Liu, Y.; Tian, X. X.; Fang, W. G. P2X7 mediates ATP-driven invasiveness in prostate cancer cells. *PLoS ONE* 2014, 9, 1-22.
- 137- a) Massicot, F.; Hache, G.; David, L.; Chen, D.; Leuxe, C.; Garnier-Legrand, L.; Rat, P.; Laprévotte, O.; Coudoré, F. P2X7 cell death receptor activation and mitochondrial impairment in oxaliplatin-induced apoptosis and neuronal injury: cellular mechanisms and in vivo approach. *PLoS ONE* 2013, 8, 1-15; b) Miras-Portugal, M. T.; Sebastián-Serrano, A.; García, L. D.; Díaz-Hernández, M. Neuronal P2X7 receptor: involvement in neuronal physiology and pathology. *J. Neuroscience* 2017, 37, 7063-7072.

- 138- Savio, L. E. B.; Mello, P. A.; da Silva, C. G.; Coutinho-Silva, R. The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon? *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 1-31.
- 139- a) Burnstock, G.; Knight, G. E. The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signalling* 2018, 14, 1-18; b) Miller, C. M.; Boulter, N. R.; Fuller, S. J.; Zakrzewski, A. M.; Lees, M. P.; Saunders, B. M.; Wiley, J. S.; Smith, N. C. The role of the P2X7 receptor in infectious diseases. *PLoS Pathogens* 2011, 7, 1-7.
- 140- Labasi, J. M.; Petrushova, N.; Donovan, C.; McCurdy, S.; Lira, P.; Payette, M. M.; Brissette, W.; Wicks, J. R.; Audoly, L.; Gabel, C. A. Absence of the P2X7 receptor alters leukocyte function and attenuates an inflammatory response. *J. Immunol.* 2002, 168, 6436-6445.
- 141- a) Yin, J.; Xu, K.; Zhang, J.; Kumar, A.; Yu, F. -S. X. Wound-induced ATP release and EGF receptor activation in epithelial cells. *J. of Cell Science* 2007, 120, 815-825; b) Samuels, S. E.; Lipitz, J. B.; Dahl, G.; Muller, K. J. Neuroglial ATP release through innexin channels controls microglial cell movement to a nerve injury. *J. Gen. Physiol.* 2010, 136, 425-442.
- 142- Pellegatti, P.; Raffaghello, L.; Bianchi, G.; Piccardi, F.; Pistoia, V.; Di Virgilio, F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE* 2008, 3, 1-9.
- 143- Di Virgilio, F.; Giuliani, A. L. Purinergic signalling in autoimmunity: a role for the P2X7R in systemic lupus erythematosus? *Biom. J.* 2016, 39, 326-338.
- 144- Park, J. -H.; Kim, Y. -C. P2X7 receptor antagonists: a patent review (2010–2015). *Expert Opin. Ther. Pat.* 2017, 27, 257-267.
- 145- a) Stock, T. C.; Bloom, B. J.; Wei, N.; Ishaq, S.; Park, W.; Wang, X.; Gupta, P.; Mebus, C. A. Efficacy and safety of CE-224,535, an antagonist of P2X7 receptor, in treatment of patients with rheumatoid arthritis inadequately controlled by methotrexate. *J. Rheumatol.* 2012, 39, 720-727; b) Keystone, E. C.; Wang, M. M.; Layton, M.; Hollis, S.; McInnes, I. B. Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. *Ann. Rheum. Dis.* 2012, 71, 1630-1635.
- 146- Adinolfi, E.; Giuliani, A. L.; de Marchi, E.; Pegoraro, A.; Orioli, E.; Di Virgilio, F. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 2018, 151, 234-244.
- 147- Wang, Z.; Cole P. A. Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol.* 2014, 548, 1-21.
- 148- Fry, A. M.; O'Regan, L.; Sabir, S. R.; Bayliss, R. Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J. Cell Sci.* 2012, 125, 4423-4433.
- 149- Beharry, Z.; Mahajan, S.; Zemskova, M.; Lin, Y. -W.; Tholanikunnel, B. G.; Xia, Z.; Smith, C. D.; Kraft, A. S. The Pim protein kinases regulate energy metabolism and cell growth. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 528-533.
- 150- Unger, G. M.; Davis, A. T.; Slaton, J. W.; Ahmed, K. Protein kinase CK2 as regulator of cell survival: implications for cancer therapy. *Curr. Cancer Drug Targets*, 2004, 4, 77-84.

- 151- Zhao, M.; Xia, L.; Chen, G. Protein kinase C δ in apoptosis: a brief overview. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2012, 60, 361-372.
- 152- a) Hunter, T.; Karint, M. The Regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 1992, 70, 375-387; b) Ray, A.; Ray, P.; Guthrie, N.; Shakya, A.; Kumar, D.; Ray, B. K. Protein kinase a signaling pathway regulates transcriptional activity of SAF-1 by unmasking its DNA-binding domains. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 22586-22595.
- 153- Cohen, P. Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002, 1, 309-315.
- 154- Bhullar, K. S.; Lagarón, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P.; Rupasinghe, H. P. V. Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer* 2018, 17, 1-20.
- 155- Okamoto, H.; Kobayashi, A. Tyrosine kinases in rheumatoid arthritis. *J. Inflammation* 2011, 8, 2-7.
- 156- Wagey, R. I. E.; Krieger, C. Abnormalities of protein kinases in neurodegenerative diseases in *Progress in Drug Research*. (Ed. Lucker, E.), vol. 71, Birkhauser Verlag, Switzerland, pp. 136-175, 1998.
- 157- Shchemelinin, I.; Šefc, L.; Nečas, E. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol.* 2006, 52, 81-101.
- 158- Robinson, D. R.; Wu, Y. -M.; Lin, S. -F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000, 19, 5548-5557.
- 159- Hubbard, S. R.; Till, J. H. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 2000, 69, 373-398.
- 160- Maruyama, I. N. mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. *Cells* 2014, 3, 304-330.
- 161- Butti, R.; Das, S.; Gunasekaran, V. P.; Yadav, A. S.; Kumar, D.; Kundu, G. C. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol. Cancer* 2018, 17, 1-18.
- 162- Vogelstein, B.; Papadopoulos, N.; Velculescu, V. E.; Zhou, S.; Diaz, Jr. L. A.; Kinzler, K. W. Cancer genome landscapes. *Science* 2013, 29, 1546-1558.
- 163- a) Du, Z.; Lovly, C. M. Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol. Cancer* 2018, 17, 1-13; b) McMahon, G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *The Oncologist* 2000, 5, 3-10; c) Barbera-Guillem, E.; Nyhus, J. K.; Wolford, C. C.; Friece, C. R.; Sampsel, J. W. Vascular endothelial growth factor secretion by tumor-infiltrating macrophages essentially supports tumor angiogenesis, and IgG immune complexes potentiate the process. *Cancer Res.* 2002, 62, 7042-7049.
- 164- a) Regad, T. Targeting RTK Signaling Pathways in Cancer. *Cancers* 2015, 7, 1758-1784; b) Yamaoka, T.; Kusumoto, S.; Ando, K.; Ohba, M.; Ohmori, T. Receptor tyrosine kinase-targeted cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3491-3526.
- 165- Dorison, A.; Dussaule, J. -C.; Chatziantoniou, C. The role of discoidin domain receptor 1 in inflammation, fibrosis and renal disease. *Nephron* 2017, 137, 212-220.

- 166- a) Parker, J. C.; Douglas, I.; Bell, J.; Comer, D.; Bailie, K.; Skibinski, G.; Heaney, L. G.; Shields, M. D. Epidermal growth factor removal or tyrphostin AG1478 treatment reduces goblet cells & mucus secretion of epithelial cells from asthmatic children using the airliquid interface model. *PLoS ONE* 2015, 10, 1-12; b) Burgel, P. -R.; Nadel, J. A. Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax* 2004, 59, 992-996.
- 167- Hur, G. Y.; Lee, S. Y.; Lee, S. H.; Kim, S. J.; Lee, K. J.; Jung, J. Y.; Lee, E. J.; Kang, E. H.; Jung, K. H.; Lee, S. Y.; Kim, J. H.; Shin, C.; Shim, J. J.; In, K. H.; Kang, K. H.; Yoo, S. H. Potential use of an anticancer drug gefinitib, an EGFR inhibitor, on allergic airway inflammation. *Exp. Mol. Med.* 2007, 39, 367-375.
- 168- Le Cras, T. D.; Acciani, T. H.; Mushaben, E. M.; Kramer, E. L.; Pastura, P. A.; Hardie, W. D.; Korfhagen, T. R.; Sivaprasad, U.; Ericksen, M.; Gibson, A. M.; Holtzman, M. J.; Whitsett, J. A.; Hershey, G. K. K. Epithelial EGF receptor signaling mediates airway hyperreactivity and remodeling in a mouse model of chronic asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2011, 300, L414-L421.
- 169- a) Amishima, M.; Munkata, M.; Nasuhara, Y.; Sato, Y.; Takahashi, T.; Homma, Y.; Kawakami, Y. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor immunoreactivity in the asthmatic human airway. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1997, 157, 1907-1912; b) Hamilton, L. M.; Torres-Lozano, C.; Puddicombe, S. M.; Richter, A.; Kimber, I.; Dearman, R. J.; Vrugt, B.; Aalbers, R.; Holgate, S. T.; Djukanović, R.; Wilson, S. J.; Davies, D. E. The role of the epidermal growth factor receptor in sustaining neutrophil inflammation in severe asthma. *Clin. Exp. Allergy* 2003, 33, 233-240.
- 170- a) Vallath, S.; Hynds, R. E.; Succony, L.; Janes, S. M.; Giangreco, A. Targeting EGFR signalling in chronic lung disease: therapeutic challenges and opportunities. *Eur. Respir. J.* 2014, 44, 513-522; b) Borza, C. M.; Pozz, A. Discoidin domain receptors in disease. *Matrix Biol.* 2014, 34, 185-192; c) Frenzel, L.; Hermine, O. Mast cells and inflammation. *Jt. Bone, Spine* 2013, 80, 141-145; d) Lee, J.; Ryu, S. -H.; Kang, S. M.; Chung, W. -C.; Gold, K. A.; Kim, E. S.; Hittelman, W. N.; Hong, W. K.; Koo, J. S. Prevention of bronchial hyperplasia by EGFR pathway inhibitors in an organotypic culture model. *Cancer Prev. Res. (Phila)* 2011, 4, 1306-1315; e) Nadel, J. A. Role of epidermal growth factor receptor activation in regulating mucin synthesis. *Respir. Res.* 2001, 2, 85-89; f) Grimminger, F.; Schermuly, R. T.; Ghofrani, H. A. Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2010, 9, 956-970.
- 171- Stoffel, A. Targeted therapies for solid tumors. *Biodrugs* 2010, 24, 303-316.
- 172- Gocek, E.; Moulas, A. N.; Studzinski, G. P. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2014, 51, 125-137.
- 173- Paige, L. A.; Nadler, M. J. S.; Harrison, M. L.; Cassady, J. M.; Geahlen, R. L. Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56(Lck). *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 8669-8674.
- 174- a) Neet, K.; Hunter, T. Vertebrate non-receptor protein-tyrosine kinase families, *Genes Cells* 1996, 1, 147-169; b) Schenk, P. W.; Snaar-Jagalska, B. E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1449, 1-24.

- 175- Hubbard, S. R. Protein tyrosine kinases: autoregulation and small-molecule inhibition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2002, 12, 735-741.
- 176- Krause, D. S.; Van Etten, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N. Engl. J. Med.* 2005, 353, 172-187.
- 177- a) Ihle, J. N. Cytokine receptor signalling. *Nature*, 1995, 377, 591-594; b) Solouki, S.; August, A.; Huang, W. Non-receptor tyrosine kinase signaling in autoimmunity and therapeutic implications. *Pharmacol. Ther.* 2019, 201, 39-50.
- 178- a) Kypta, R. M.; Goldberg, Y.; Ulug, E. T.; Courtneidge, S. A. Association between the PDGF receptor and members of the Src family of tyrosine kinases. *Cell* 1990, 62, 481-492; b) Smoot, R. L.; Werneburg, N. W.; Sugihara, T.; Hernandez, M. C.; Yang, L.; Mehner, C.; Graham, R. P.; Bronk, S. F.; Truty, M. J.; Gores, G. J. Platelet-derived growth factor regulates YAP transcriptional activity via Src family kinase dependent tyrosine phosphorylation. *J. Cell. Biochem.* 2017, 119, 824-836; c) Kuo, T. -L.; Cheng, K. -H.; Shan, Y. -S.; Chen, L. -T.; Hung, W. -C. β -catenin-activated autocrine PDGF/Src signaling is a therapeutic target in pancreatic cancer. *Theranostics* 2019, 9, 324-336.
- 179- Heinrich, P. C.; Behrmann, I.; Haan, S.; Hermanns, H. M.; Muller-Newen, G.; Schaper, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 2003, 374, 1-20.
- 180- Meltser, V.; Ben-Yehoyada, M.; Shau, Y. C-Abl tyrosine kinase in the DNA damage response: cell death and more. *Cell Death Differ.* 2011, 18, 2-4.
- 181- a) Yin, B. Focal adhesion kinase as a target in the treatment of hematological malignancies. *Leuk Res.* 2011, 35, 1416-1418; b) Playford, M. P.; Vadali, K.; Cai, X.; Burrige K.; Schaller, M. D. Focal adhesion kinase regulates cell-cell contact formation in epithelial cells via modulation of Rho. *Exp. Cell Res.* 2008, 314, 3187-3197.
- 182- a) Siveen, K. S.; Prabhu, K. S.; Achkar, I. W.; Kuttikrishnan, S.; Shyam, S.; Khan, A. Q.; Merhi, M.; Dermime, S.; Uddin, S. Role of non- receptor tyrosine kinases in hematological malignances and its targeting by natural products. *Mol. Cancer* 2018, 17, 1-21; b) Scheijen, B.; Griffin, J. D. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 2002, 21, 3314-3333.
- 183- Gomez-Puerta, J. A.; Mócsai, A. Tyrosine kinase inhibitors for the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013, 13, 760-773.
- 184- Shao, W. -H.; Cohen, P. L. The role of tyrosine kinases in systemic lupus erythematosus and their potential as therapeutic targets. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2014, 10, 573-582.
- 185- Roskosk, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: a 2020 update. *Pharmacol. Res.* 2019, 152, 1-67.
- 186- Levitzki, A.; Mishani, E. Tyrosine kinase inhibitors and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu. Rev. Biochem.* 2006, 75, 93-109.
- 187- Yaish, P.; Gazit, A.; Gilon, C.; Levitzki, A. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science* 1988, 242, 933-935.

- 188- Gazit, A.; Yaish, P.; Gilon, C.; Levitzki, A. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* 1989, 32, 2344-2352.
- 189- Shechter, Y.; Yaish, P.; Chorev, M.; Gilon, C.; Braun, S.; Levitzki, A. Inhibition of insulin-dependent lipogenesis and anti-lipolysis by protein tyrosine kinase inhibitors. *EMBO J.* 1989, 8, 1671-1676.
- 190- Brown, H. C.; Rao, B. C. S. A New technique for the conversion of olefins into organoboranes and related alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, 78, 5694-5695.
- 191- a) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A new stereospecific cross-coupling by the palladium-catalyzed reaction of 1-alkenylboranes with 1-alkenyl or 1-alkynyl halides. *Tetrahedron Lett.* 1979, 20, 3437-3440; b) Miyaura, N.; Suzuki, A. Stereoselective synthesis of arylated (*E*)-alkenes by the reaction of alkenylboranes with aryl halides in the presence of palladium catalyst. *Chem. Commun.* 1979, 866-867.
- 192- Lam, P. Y. S.; Clark, C. G.; Saubern, S.; Adams, J.; Winters, M. P.; Chan, D. M. T.; Combs, A. New aryl/heteroaryl C-N bond cross-coupling reactions via arylboronic acid/cupric acetate arylation. *Tetrahedron Lett.* 1998, 39, 2941-2944.
- 193- a) Baker, S. J.; Ding, C. Z.; Akama, T.; Zhang, Y. -K.; Hernandez, V.; Xia, Y. Therapeutic potential of boron-containing compounds, *Future Med. Chem.* 2009, 1, 1275-1288; b) Soriano-Ursúa, M. A.; Farfán-García, E. D.; López-Cabrera, Y.; Querejeta, E.; Trujillo-Ferrara, J. G. Boron-containing acids: preliminary evaluation of acute toxicity and access to the brain determined by Raman scattering spectroscopy. *Neurotoxicology* 2014, 40, 8-15.
- 194- Kane, R. C. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 2955-2960.
- 195- a) Raedler, L. A. Ninlaro (Ixazomib): First oral proteasome inhibitor approved for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Am. Health Drug Benefits* 2016, 9, 102-105; b) Moreau, P.; Masszi, T.; et al. oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 2016, 374, 1621-1634.
- 196- a) Trippier, P. C.; McGuigan, C. Boronic acids in medicinal chemistry: anticancer, antibacterial and antiviral applications. *Med. Chem. Commun.* 2010, 1, 183-198; b) Yang, F.; Zhu, M.; Zhang, J.; Zhou, H. Synthesis of biologically active boron-containing compounds. *Med. Chem. Comm.* 2018, 9, 201-211.
- 197- Hall, D. G. Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis and medicine-structure, properties, and preparation of boronic acid derivatives: overview of their reaction and applications. (Ed. Hall, D. G.), 1^a. ed., Wiley-VCH, Weinheim, cap. 1, pp. 1-15, 2005.
- 198- a) Lacina, K.; Skládal, P.; James, T. D. Boronic acids for sensing and others applications- a mini-review of papers published in 2013. *Chem Cent. J.* 2014, 8, 1-17; b) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. Boronic acids compounds as potential pharmaceutical agents. *Med. Res. Rev.* 2003, 23, 346-368.
- 199- Sana, M.; Leroy, G.; Wilante, C. Enthalpies of formation and Bond-energies in lithium, beryllium, and boron derivatives - a theoretical attempt for data rationalization. *Organometallics* 1991, 10, 264.
- 200- a) Marinaro, W. A.; Schieber, L. J.; Munson, E. J.; Day, V. W.; Stella, V. J. Properties of a model aryl boronic acid and its boroxine. *J. Pharma. Sci.* 2012, 101, 3190-3198; b) Bhat, K. L.; Markham, G. D.;

Larkin, J. D.; Bock, C. W. Thermodynamics of boroxine formation from the aliphatic boronic acid monomers R-B(OH)₂ (R = H, H₃C, H₂N, HO, and F): a computational investigation. *J. Phys. Chem. A* 2011, 115, 7785-7793; c) Adamczyk-Wozniak, A.; Kaczorowska, E.; Kredatusova, J.; Madura, I.; Marek, P.; Matuszewska, A.; Sporzyński, A.; Uchman, M. Dehydration of ortho-, meta- and para-alkoxy phenylboronic acids to their corresponding boroxines. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2018, 13, 1492-1498; d) Cousin, D.; Mann, J.; Nieuwenhuyzen, M.; van den Berg, H. Cousin, A new approach to combretastatin D2. *Org. Biomol. Chem.* 2006, 4, 54-62; e) Snyder, H. R.; Reedy, A. J.; Lennarz, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 835-838; f) Sigma-Aldrich: 4-formylphenylboronic acid. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/431966?lang=pt®ion=BR&gclid=Cj0KCQjwhtT1BRCiARIsAGIY51JzbqUAZA8BXb3kdLHszFI7qAJxHksNOVPk3t4nRh1ziDAJU-MhpUwaAoprEALw_wcB>. Acessado em: 8 Maio de 2020.

201- Brooks, W. L. A.; Sumerlin, B. S. Synthesis and applications of boronic acid-containing polymers: from materials to medicine. *Chem. Rev.* 2016, 116, 1375-1397.

202- a) Korich, A. L.; Iovine, P. M. Boroxine chemistry and applications. *Dalton Trans.* 2010, 39, 1423-1431; b) Tokunaga, Y. Boroxine chemistry: from fundamental studies to applications in supramolecular and synthetic organic chemistry. *Heterocycles* 2013, 87, 991-1021; c) Clair, S.; Abel, M.; Porte, L. Growth of boronic acid based two-dimensional covalent networks on a metal surface under ultrahigh vacuum. *Chem. Commun.* 2014, 50, 9627-9635; d) Fujita, N.; Shinkai, S.; James, T. D. Boronic acids in molecular self-assembly. *Chem. Asian J.* 2008, 3, 1076-1091.

203- a) Gilman, H.; Santucci, L.; Swayampati, D. R.; Ranck, R. O. Hydroxybenzeneboronic acids and anhydrides. *J. Am. Chem. Soc.* 1957, 79, 3077; b) Gilman, H.; Santucci, L. Some bromine-containing and sulfur-containing aromatic boronic acids. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 193.

204- Snyder, H. R.; Konecky, M. S.; Lennarz, W. J. Aryl boronic acids. II. Aryl boronic anhydrides and their amine complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, 80, 3611.

205- Hall, D. G. Boronic acid catalysis. *Chem. Soc. Rev.* 2019, 48, 3475-3496.

206- Lopalco, A.; Stella, V. J.; Thompson, W. H. Origins, and formulation implications, of the pK_a difference between boronic acids and their esters: A density functional theory study. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018, 124, 10-16.

207- Brooks, W. L. A.; Deng, C. C.; Sumerlin, B. S. Structure–reactivity relationships in boronic acid–diol complexation. *ACS Omega* 2018, 3, 17863–17870.

208- Whyte, G. F.; Vilar, R.; Woscholski, R. Molecular recognition with boronic acids-applications in chemical biology. *J. Chem. Biol.* 2013, 6, 161-174.

209- a) Gluza, K.; Kafarski, P. Transition state analogues of enzymatic reaction as potential drugs. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/drug-discovery/transition-state-analogues-of-enzymatic-reaction-as-potential-drugs>>. Acessado em: 18 Jan de 2020; b) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. Boronic acids: preparation and applications in organic synthesis and medicine - biological and medicinal applications of boronic acids. (Ed. Hall, D. G.), 1^a. ed., Wiley-VCH, Weinheim, cap. 13, pp. 481-487, 2005.

- 210- a) Zhang, J.; Zhu, M.; Hu, Y. L.; Zhou, C. The synthesis of benzoxaboroles and their applications in medicinal chemistry. *Sci. China Chem.* 2013, 56, 1372-1381; b) Adamczyk-Wozniak, A.; Cyranski, M. K.; Zubrowska, A.; Sporzynski, A. Benzoxaboroles e old compounds with new applications. *J. Organomet. Chem.* 2009, 694, 3533-3541.
- 211- a) Liu, X. -C.; Scouten, W. H. Boronate affinity chromatography. *Methods Mol. Biol.* 2000, 147, 119; b) Lacina, K.; Skládal, P.; James, T. D. Boronic acids for sensing and other applications - a mini-review of papers published in 2013. *Chem. Cent. J.* 2014, 8, 60; c) Li, H.; Liu, Z. Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography. *Trends Anal. Chem.* 2012, 37, 148; d) Côté, A. P.; Benin, A. I.; Ockwig, N. W.; O’Keeffe, M.; Matzger, A. J.; Yaghi, O. M. Porous, crystalline, covalent organic frameworks. *Science* 2005, 310, 1166-1170.
- 212- a) Fu, H.; Fang, H.; Sun, J.; Wang, H.; Liu, A.; Sun, J.; Wu, Z. Boronic acid-based enzyme inhibitors: a review of recent progress. *Curr. Med. Chem.* 2014, 21, 3271-3280; b) Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. Boronic acid compounds as potential pharmaceutical agents. *Res. Rev.* 2013, 23, 346-368.
- 213- Smoum, R.; Rubinstein, A.; Dembitsky, V. M.; Srebnik, M. Boron containing compounds as protease inhibitors. *Chem. Rev.* 2012, 112, 4156-4220.
- 214- a) Momose, I.; Abe, H.; Watanabe, T.; Ohba, S. -I.; Yamazaki, K.; Dan, S.; Yamori, T.; Masuda, T.; Nomoto, A. Antitumor effects of tyropeptin-boronic acid derivatives: new proteasome inhibitors. *Cancer Sci.* 2014, 105, 1609-1615; b) Han, L. -Q.; Yuan, Y.; Wu, X. -Y.; Li, R. -D.; Xu, B.; Cheng, Q.; Liu, Z. -M.; Zhou, T. Y.; An, H. -Y.; Wang, X.; Cheng, T. -M.; Ge, Z. -M.; Cui, J. -R.; Li, R. -T. Urea-containing peptide boronic acids as potent proteasome inhibitors. *Eur. J. Org. Chem.* 2017, 125, 925-939.
- 215- a) Ivanenkov, Y. A.; Chufarova, N. V. Small-molecule arginase inhibitors. *Pharm. Pat. Anal.* 2014, 3, 65-85; b) Kim, N. N.; Cox, J. D.; Baggio, R. F.; Emig, F. A.; Mistry, S. K.; Harper, S. L.; Speicher, D. W.; Morris, S. M.; Ash, D. E.; Traish, A.; Christianson, D. W. Probing erectile function: S-(2-boronoethyl)-l-cysteine binds to arginase as a transition state analogue and enhances smooth muscle relaxation in human penile corpus cavernosum. *Biochem.* 2001, 40, 2678-2688.
- 216- Baker, J. S.; Tomsho, J. W.; Benkovic, S. J. Boron-containing inhibitors of synthetases. *Chem. Rev.* 2011, 40, 4279-4285.
- 217- Zervosen, A.; Sauvage, E.; Frère, J. -M.; Charlia, P.; Luxen, A. Development of new drugs for an old target - the penicillin binding proteins. *Molecules* 2012, 17, 12478-12505.
- 218- a) Philipp, M.; Bender, M. L. Inhibition of serine proteases by arylboronic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1971, 68, 478-480; b) Matheus, D. A.; Alden, R. A.; Birkoft, J. J.; Freer, S. T.; Kraut, J. X-ray crystallographic study of boronic acid adducts with sbtilisin BPN’. *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 7120-7126.
- 219- Bush, K.; Bradford, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, 6, 1-22.
- 220- Kimberly, A.; Toussaint, K. A.; Gallagher, J. C. β -Lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: from then to now. *Ann. Pharmacother.* 2015, 49, 86-98.

- 221- Morandi, S.; Morandi, F.; Caselli, E.; Shoichet, B. K.; Prati, F. Structure-based optimization of cephalothin-analogue boronic acids as β -lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 1195-1205.
- 222- a) Tondi, D.; Venturelli, A.; Bonnet, R.; Pozzi, C.; Shoichet, B. K.; Costi, M. P. Targeting class A and C serine β -lactamases with a broad-spectrum boronic acid derivative. *J. Med. Chem.* 2014, 57, 5449-5458; b) Zhou, J.; Stapleton, P.; Haider, S.; Healy, J. Boronic acid inhibitors of the class A β -lactamase KPC-2. *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 2921-2927; c) Tondi, D.; Powers, R. A.; Caselli, E.; Negri, M. -C.; Blázquez, J.; Costi, M. P.; Shoichet, B. K. Structure-based design and in-parallel synthesis of inhibitors of AmpC β -lactamase. *Chem. Biol.* 2001, 8, 593-610.
- 223- Touchet, S.; Carreaux, F.; Carboni, B.; Bouillonb, A.; Boucher, J. -L. Aminoboronic acids and esters: from synthetic challenges to the discovery of unique classes of enzyme inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 3895-3914.
- 224- a) Shimizu, K.; Maruyama, M.; Yasui, Y.; Minegishi, H.; Ban, H. S.; Nakamura, H. Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 1453-1456; b) LeBeau, A. M.; Singh, P.; Isaacs, J. T.; Denmeade, S. R. Potent and selective peptidyl boronic acid inhibitors of the serine protease prostate-specific antigen. *Chem. Biol.* 2008, 15, 665-674; c) Bradke, T. M.; Hall, C.; Carper, S. W.; Plopper, G. E. Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adh. Migr.* 2008, 2, 153-160.
- 225- van Vuuren, R. J.; Visagie, M. H.; Theron, A. E.; Joubert, A. M. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2015, 76, 1101-1112.
- 226- Meunier, S.; Vernos, I. Microtubule assembly during mitosis-from distinct origins to distinct functions? *J. Cell Sci.* 2012, 125, 2805-2814.
- 227- Brandão, H. N.; David, J. P.; Coutoll, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim. Nova* 2010, 33, 1359-1369.
- 228- Kong, Y.; Grembecka, J.; Edler, M. C.; Hamel, E.; Mooberry, S. L.; Sabat, M.; Rieger, J.; Brown, M. L. Structure-based discovery of a boronic acid bioisostere of combretastatin A-4. *Chem. Biol.* 2005, 12, 1007-1014.
- 229- Nakamura, H.; Kuroda, H.; Saito, H.; Suzuki, R.; Yamori, T.; Maruyama, K.; Haga, T. Synthesis and biological evaluation of boronic acid containing *cis*-stilbenes as apoptotic tubulin polymerization inhibitors. *ChemMedChem* 2006, 1, 729-740.
- 230- Ban, H. S.; Usui, T.; Nabeyama, W.; Morita, H.; Fukusawa, K.; Nakamura, H. Discovery of boron-conjugated 4-anilinoquinazoline as a prolonged inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 4415-4427.
- 231- Wang, W.; Yin, R.; Zhang, M.; Yu, R.; Hao, C.; Zhang, L.; Jiang, T. Boronic acid modifications enhance the anti-influenza virus activities of novel quindoline derivatives. *J. Med. Chem.* 2017, 60, 2840-2852.

- 232- a) Jones, G. The Knoevenagel condensation. *Org. React.* 2011, 15, 204-599; b) Bordwell, F. G. Bordwell pKa table. Disponível em: <<https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/pkatable/>> Acessado em: 8 Maio de 2020.
- 233- Kolb, K. E.; Field, K. W.; Schatz, P. F. A one-step synthesis of cinnamic acids using malonic acid: the Verley-Doebner modification of the Knoevenagel condensation. *J. Chem. Educ.* 1990, 67, A304.
- 234- Rupainwar, R.; Pandey, J.; Smriti, S.; Ruchi, R. The importance and applications of Knoevenagel reaction (brief review). *Orient. J. Chem.* 2019, 35, 423-429.
- 235- Li, J. J.; Johnson, D. S.; Sliskovic, D. R.; Roth, B. D. Contemporary drug synthesis, 1^a. ed., Wiley-Interscience, New Jersey, 2004.
- 236- Madivada, L. R.; Anumala, R. R.; Gilla, G.; Alla, S.; Charagondla, K.; Kagga, M.; Bhattacharya, A.; Bandichhor, R. An improved process for pioglitazone and its pharmaceutically acceptable salt. *Org. Process Res. Dev.* 2009, 13, 1190-1194.
- 237- Anastas, P. T.; Warner, J. C. Green chemistry: theory and practice. Oxford University Press Inc., NY, pp. 8-30, 2000.
- 238- a) Glasnov, T. N.; Kappe, C. O. The Microwave-to-Flow Paradigm: Translating High-Temperature Batch Microwave Chemistry to Scalable Continuous-Flow Processes. *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 11956-11968; b) Mouterde, L. M. M.; Allais, F. Microwave-assisted Knoevenagel-Doebner reaction: an efficient method for naturally occurring phenolic acids synthesis. *Front. Chem.* 2018, 6, 1-7; c) Biradar, J. S.; Sasidhar, B. S. Solvent-free, microwave assisted Knoevenagel condensation of novel 2,5-disubstituted indole analogues and their biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 6112-6118.
- 239- Chakrabarty, M.; Mukherji, A.; Arima, S.; Harigaya, Y.; Pilet, G. Expedient reaction of ninhydrin with active methylene compounds on montmorillonite K10 clay. *Monatsh Chem.* 2009, 140, 189-197.
- 240- Pratap, U. R.; Jawale, D. V.; Waghmare, R. A.; Lingampallea, D. L.; Mane, R. A. Synthesis of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones by Knoevenagel condensation catalyzed by baker's yeast. *New J. Chem.* 2011, 35, 49-51.
- 241- a) Ronga, L.; Li, X.; Wang, H.; Shia, D.; Tua, S.; Zhuang, Q. Efficient green procedure for the Knoevenagel condensation under solvent-free conditions. *Synth. Comm.* 2006, 36, 2407-2412; b) Jenner, G. Steric effects in high pressure Knoevenagel reactions. *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 243-245; c) van Schijndel, J.; Canalle, L. A.; Molendijk, D.; Meuldijk, J. The green Knoevenagel condensation: solvent-free condensation of benzaldehydes. *Green Chem. Lett. Rev.* 2017, 10, 404-411.
- 242- a) Hangarge, R. V.; Jarikoteb, D. V.; Shingare, M. S. Knoevenagel condensation reactions in an ionic liquid. *Green Chem.* 2002, 4, 266-268; b) Darvatkar, N. B.; Deorukhkar, A. R.; Bhilare, S. V.; Salunkhe, M. M. Ionic liquid-mediated Knoevenagel condensation of Meldrum's acid and aldehydes. *Synth. Commun.* 2006, 36, 3043-3051.
- 243- a) Bigi, F.; Conforti, M. L.; Maggi, R.; Piccinno, A.; Sartori, G. Clean synthesis in water: uncatalysed preparation of ylidenemalononitriles. *Green Chem.* 2000, 2, 101-103; b) Bigi, F.; Quarantelli, C. The Knoevenagel condensation in water. *Curr. Org. Synth.* 2012, 9, 31-39; c) Ferreira, J. M. G. O.; Resende, J.

- B. M.; Batista, P. K.; Teotonio, E. E. S.; Vale, J. A. Rapid and efficient uncatalyzed Knoevenagel condensations from binary mixture of ethanol and water. *J. Braz. Chem. Soc.* 2018, 29, 1382-1387.
- 244- da Silva, F. M.; Jones, Jr. J. Reações orgânicas em meio aquoso. *Quim. Nova* 2001, 24, 646-657.
- 245- a) Jain, K.; Chaudhuri, S.; Palc, K.; Das, K. The Knoevenagel condensation using quinine as an organocatalyst under solvent-free conditions. *New J. Chem.* 2019,43, 1299-1304; b) Vekariya, R. H.; Patel, H. D. Recent advances in the synthesis of coumarin derivatives via knoevenagel condensation: a review. *Synth. Commun.* 2014, 44, 2756-2788; c) Wada, S.; Suzuki, H. Calcite and fluorite as catalyst for the Knövenagel condensation of malononitrile and methyl cyanoacetate under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.* 2003, 44, 399-401; d) Kantam, M. L.; Choudary, B. M.; Reddy, C. V.; Rao, K. K.; Figueras, F. Aldol and Knoevenagel condensations catalysed by modified Mg-Al hydrotalcite: a solid base as catalyst useful in synthetic organic chemistry. *Chem. Commun.* 1998, 9, 1033-1034.
- 246- a) Dalessandro, E. V.; Collin, H. P.; Guimarães, L. G. L.; Valle, M. S.; Pliego, Jr. J. R. Mechanism of the piperidine-catalyzed knoevenagel condensation reaction in methanol: the role of iminium and enolate ions. *J. Phys. Chem. B.* 2017, 121, 5300-5307; b) Rikuhei, T.; Naoto, K.; Aritsune. K. Stereochemistry of amine-catalyzed Knoevenagel reactions. *Chem. Lett.* 1985, 14, 1583-1586.
- 247- a) Mase, N.; Horibe, T. Organocatalytic knoevenagel condensations by means of carbamic acid ammonium salts. *Org. Lett.* 2013, 15, 1854-1857; b) Tietze, L. F.; Beifuss, U. The Knoevenagel reaction. (Ed. Trost, B.M.), Pergamon Press, Oxford, pp. 341-345, 1991.
- 248- a) Lou, T.; Liao, E. -T.; Wilsily, A.; Fillion, E. Catalytic Intramolecular Friedel-Crafts Reaction of Benzyl Meldrum's Acid Derivatives: Preparation of 5,6-dimethoxy-2-Methyl-1-Indanone. *Org. Synth.* 2012, 89, 115-125; c) Fioravanti, S. F.; Pellacani, L.; Tardella, P. A.; Vergari, M. C. Facile and Highly Stereoselective One-Pot Synthesis of Either (*E*)- or (*Z*)-Nitro Alkenes. *Org. Lett.* 2008, 10, 1449- 1451.
- 249- Gupta, P.; Mahajan, A. Green chemistry approaches as sustainable alternatives to conventional strategies in pharmaceutical industry. *RSC Adv.* 2015, 5, 26686-26705.
- 250- a) Breslow, R. Reactions in water - handbook of green chemistry. (Ed. Li, C. -J.), Wiley-VCH, Weinheim, pp. 1-3, 2010; b) Wei, W.; Keh, C. C. K.; Li, C. -J.; Varma, R. S. Water as a reaction medium for clean chemical processes. *Clean Techn. Environ. Policy* 2005, 7, 62-69.
- 251- Hiller, N, J.; de Silva, N. A. A.; Faria, R. X.; Souza, A. L. A.; Resende, J. A. L. C.; Farias, A. B.; Romeiro, N. C.; Martins, D. L. Synthesis and evaluation of anticancer and trypanocidal activities of boronic tyrophostins. *ChemMedChem* 2018, 13, 1395-1404.
- 252- P. A. Cox, A. G. Leach, A. D. Campbell, G. C. Lloyd-Jones, Protodeboronation of heteroaromatic, vinyl, and cyclopropyl boronic acids: Ph-rate profiles, autocatalysis, and disproportionation. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, 138, 9145-9157.
- 253- a) Zhang, G.; Li, Y.; Liu, J. Acid-promoted metal-free protodeboronation of arylboronic acids. *RSC Adv.* 2017, 7, 34959-34962; b) Cox, P. A.; Reid, M.; Leach, A. G.; Campbell, A. D.; King, E. J.; Lloyd-Jones, G. C. Base-catalyzed aryl-B(OH)₂ protodeboronation revisited: from concerted proton-transfer to liberation of a transient arylanion. *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 13156-13165.

- 254- Freeman, F. Properties and reactions of ylidenemalononitriles. *Chem. Rev.* 1980, 80, 329.
- 255- Singh, M.; Inaoka, S.; Iwata, K.; Saha, S. Towards the critical understanding of selected vibrational features in biologically important dicyano aromatic conjugated molecules: Importance of electron donating/withdrawal groups and geometry associated with dicyano group. *Spectrochim. Acta, Part A*: 2020, 224, 1-10.
- 256- El-Nahass, M. M.; Kamel, M. A.; El-deeb, A. F.; Atta, A. A.; Huthaily, S. Y. Ab initio HF, DFT and experimental (FT-IR) investigation of vibrational spectroscopy of P-N,N-dimethylaminobenzylidenemalononitrile (DBM). *Spectrochim. Acta, Part A* 2011, 79, 443-450.
- 257- Azevêdo, L. C.; Reis, M. M.; Silva, L. A.; Andrade, J. B. Efeito da presença e concentração de compostos carbonílicos na qualidade de vinhos. *Quim. Nova*, 2007, 30, 1968-1975.
- 258- Castro-Godoy, W. D.; Juan, L. C. S.; Argüello, E. A green alternative for the conversion of arylboronic acids/esters into phenols promoted by a reducing agent, sodium sulphite. *Eur. J. Org. Chem.* 2019, 19, 3035-3039.
- 259- Shen, K. K. Flame retardant polymeric materials. Recent advances in boron-based flame retardants. (Eds. Hu, Y.; Wang, X.), Taylor & Francis Group, Florida, cap. 6, pp. 97-118, 2019.
- 260- Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª. ed., LTC, Rio de Janeiro, pp. 90, 94, 103, 1994.
- 261- Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R. Introduction to Spectroscopy. 4ª ed., Brooks/Cole, Belmont, pp. 56, 64, 75, 2009.
- 262- a) Piergies, N.; Proniewicz, E.; Ozaki, Y.; Kim, Y.; Proniewicz, I. M. Influence of substituent type and position on the adsorption mechanism of phenylboronic acids: infrared, raman, and surface-enhanced raman spectroscopy studies. *J. Phys. Chem. A* 2013, 117, 5693-5705; b) Faniran, J. A.; Shurvell, H. F. Infrared spectra of phenylboronic acid (normal and deuterated) and diphenyl phenylboronate. *Canadian J. Chem.* 1968, 46, 2089-2095.
- 263- a) Cho, H.; Iwashita, T.; Hamaguchi, M.; Oyama, Y. *Chem. Pharm. Bull.* 1991, 32, 3341-3342; b) Couto, U. R. Dissertação de Mestrado- Ressonância magnética nuclear e cálculos teóricos aplicados à determinação da estereoquímica de ésteres α,β -insaturados. UNICAMP, 2017.
- 264- a) Oh, S. -W.; Weiss, J. W. E.; Kerneghan, P. A.; Korobkov, I.; Malyb, K. E.; Bryce, D. L. Solid-state ^{11}B and ^{13}C NMR, IR, and X-ray crystallographic characterization of selected arylboronic acids and their catechol cyclic esters. *Magn. Reson. Chem.* 2012, 50, 388-401; b) Wrackmeyer, B. Organoboron chemistry in modern magnetic resonance part 1. (Ed. Webb, G. A.), Springer, Dordrecht, pp. 455-457, 2008.
- 265- Cunha, S. Métodos simples de formação de monocristal de substância orgânica para estudo estrutural por difração de Raios-X. *Quim. Nova* 2008, 31, 906-909.
- 266- Farrugia, L. J. WinGX and ORTEP for Windows: an update. *J. Appl. Cryst.*, 2012, 45, 849-854.
- 267- Fernandes, W. B.; Napolitano, H. B.; Noda-Perez, C.; Martins, F. T.; Lariucci, C. Aplicações tecnológicas da metodologia cristalográfica. *Rev. Processos Químicos* 2010, 4, 19-32.

- 268- Prince, E. Mathematical, physical and chemical tables. 3^a.ed., Kluwer Academic Publishers, Holanda, pp. 796-811, 2005.
- 269- Spackman, M. A.; Jayatilaka, D. Hirshfeld surface analysis. *Cryst. Eng. Comm.* 2009, 11, 19-32.
- 270- Mervin, L. H.; Afzal, A. M.; Drakakis, G.; Lewis, R.; Engkvist, O.; Bender, A. Target prediction utilizing negative bioactivity data covering large chemical space. *J. Chem. Inform.* 2015, 7, 1-16.
- 271- ChEMBL- Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>. Acessado em: 3 de Março de 2020.
- 272- Radhakrishnan, A.; Nanjappa, V.; Raja, R.; Sathe, G.; Puttamalles, V. N.; Jain, S. M.; Balahi, S. A.; Chavan, S.; Sahasrabuddhe, N. A.; Mathur, P. P.; Kumar, M. M.; Prasad, T. S.; Santosh, V.; Sukumar, G.; Califano, J. A.; Rangarajan, A.; Sidransky, D.; Pandey, A.; Gowda, H.; Chatterjee, A. A dual specificity kinase, DYRK1A, as a potential therapeutic target for head and neck squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 2016, 6, 1-13.
- 273- Pozo, N.; Zahonero, C.; Fernández, P.; Liñares, J. M.; Ayuso, A.; Hagiwara, M.; Pérez, A.; Ricoy, J. R.; Hernández-Laín, A.; Sepúlveda, J. M.; Sánchez-Gómez, P. Inhibition of DYRK1A destabilizes EGFR and reduces EGFR-dependent glioblastoma growth. *J. Clin. Invest.* 2013, 123, 2475-2487.
- 274- Pickett, C. A.; Gutierrez-Hartmann, A. Ras mediates Src but not epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase signaling pathways in GH4 neuroendocrine cells. *Biochem.* 1994, 91, 8612-8616.
- 275- Eales-Reynolds, L. -J.; Laver, H.; Modjtahedi, H. Evidence for the expression of the EGF receptor on human monocytic cells. *Cytokine* 2001, 16, 169-172.
- 276- Zhang, S.; Chitu, V.; Stanley, E. R.; Elliott, B. E.; Greer, P. A. Fes tyrosine kinase expression in the tumor niche correlates with enhanced tumor growth, angiogenesis, circulating tumor cells, metastasis and infiltrating macrophages. *Cancer Res.* 2011, 71, 1465-1473.
- 277- Takada, Y.; Aggarwal, B. B. TNF activates Syk protein tyrosine kinase leading to TNF-induced MAPK activation, NF- κ B activation, and apoptosis. *J. Immunol.* 2004, 173, 1066-1077.
- 278- Vermelho, A. B.; Cardoso, V. S.; Ricci, Jr. E.; dos Santos, E. P.; Supuran, C. T. Nanoemulsions of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors strongly inhibit the growth of *Trypanosoma cruzi*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2018, 33, 139-146.
- 279- Luna, K. P.; Hernández, I. P.; Rueda, C. M.; Zorro, M. M.; Croft, S. L.; Escobar, P. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica* 2009, 29, 448-455.
- 280- Steverding, D.; Wang, X. Trypanocidal activity of the proteasome inhibitor and anti-cancer drug bortezomib. *Parasit. Vectors* 2009, 2, 1-4.
- 281- Brand, S.; Cheghorn, L. A. T.; McElroy, S. P.; Robinson, D. A.; Smith, V. C.; Hallyburton, I.; Harrison, J. R.; Norcross, N. R.; Spinks, D.; Bayliss, T.; Norval, S.; Stojanovski, L.; Torrie, L. S.; Frearson, J. A.; Brenk, R.; Fairlamb, A. H.; Ferguson, M. A. J.; Read, K. D.; Wyatt, P. G.; Gilbert, I. H. Discovery of a novel class of orally active trypanocidal *N*-myristoyltransferase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 140-152.

- 282- El-Sayed, N. M.; Myler, P. J.; Bartholomeu, D. C.; Nilsson, D.; Aggarwal, G.; Tran, A.; Ghedin, E.; Worthey, E. A.; Delcher, A. L.; Blandin, G. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005, 309, 409-415.
- 283- Vermelho, A. B.; de Melo, A. C. N.; Soares, R. A.; Alviano, D. S.; Souza, E. P.; Souto-Padrón, T.; Rodrigues, G. C.; de Aguiar, A. P.; Pereira, M. C.; Ferreira-Pereira, A.; Rosa, M. S. S.; Meirelles, M. N. L.; Alviano, C. S. *Trypanosoma cruzi* peptidases: an overview. *Open Parasitol. J.* 2010, 4, 120-131.
- 284- a) Smith, T. P.; Windsor, I. W.; Torest, K. T.; Raines, R. T. Stilbene boronic acids form a covalent bond with human transthyretin and inhibit its aggregation. *J. Med. Chem.* 2017, 60, 7820-7834; b) Inglis, S. R.; Zervosen, A.; Woon, E. C. Y.; Gerards, T.; Teller, N.; Fischer, D. S.; Luxen, A.; Schofield, C. J. Synthesis and evaluation of 3-(dihydroxyboryl)benzoic acids as d,d-carboxypeptidase R39 inhibitors. *J. Med. Chem.* 2009, 52, 6097-6106.
- 285- McKerrow, 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* 2009, 104, 263-269.
- 286- Santos, M. M. M.; Moreira, R. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors. *Mini. Rev. Med. Chem.* 2007, 7, 1040-1050.
- 287- Avelar, L. A. A.; Camilo, C. D.; Albuquerque, S.; Fernandes, W. B.; Gonçalves, C.; Kenny, P. W.; Leitão, A.; McKerrow, J. H.; Montanari, C. A.; Orozco, E. V. M.; Ribeiro, J. F. R.; Rocha, J. R.; Rosini, F.; Saidel, M. E. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015, 9, 1-24.
- 288- a) Volonté, C.; Apolloni, S.; Skaper, S. D.; Burnstock, G. P2X7 receptors: channels, pores and more. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 2012, 11, 705-721; b) Young, C. N. J.; Górecki, D. C. P2RX7 purinoceptor as a therapeutic target-The second coming? *Front. Chem.* 2018, 6, 1-14.
- 289- Karasawa, A.; Kawate, T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife* 2016, 5, 1-17.
- 290- Shen, J.; Cheng, F.; Xu, Y.; Li, W.; Tang, Y. Estimation of ADMET properties with substructure pattern recognition. *J. Chem. Inf. Model* 2010, 50, 1034-1041.
- 291- Pham, H.; González-Álvarez, I.; Bermejo, M.; Sanjuan, V. M.; Centelles, I.; Garrigues, T. M.; Cabrera-Pérez, M. Á. In silico prediction of Caco-2 cell permeability by a classification QSAR approach. *Mol. Inform.* 2011, 30, 376-385.
- 292- Fleming, F. F.; Yao, L.; Ravikumar, P. C.; Funk, L.; Shook, B. C. Nitrile-containing pharmaceuticals: efficacious roles of the nitrile pharmacophore. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 7902-7917.
- 293- Robinson, R. L. M.; Glen, R. C.; Mitchell, J. B. O. Development and comparison of hERG blocker classifiers: assessment on different datasets yields markedly different results. *Mol. Inform.* 2011, 30, 443-458.

- 294- Lagunin, A.; Filimonov, D.; Zakharov, A.; Xie, W.; Huang, Y.; Zhu, F.; Shen, T.; Yao, J.; Poroikov, V. Computer-aided prediction of rodent carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. *QSAR Comb. Sci.* 2009, 28, 806-810.
- 295- Cambre, J. N.; Sumerlin, B. S. Biomedical applications of boronic acid polymers. *Polymer* 2011, 52, 4631-4643.
- 296- Faria, R. X.; Hiller, N. J.; Salles, J. P.; Resende, J. A. L. C.; Diogo, R. T.; von Ranke, N. L.; Bello, M. B.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C.; Martins, D. L. Arylboronic acids inhibit P2X7 receptor function and the acute inflammatory response. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2019, 51, 277-290.
- 297- Faria, R. X.; Oliveira, F. H.; Salles, J. P.; Oliveira, A. S.; von Ranke, N. L.; Bello, M. L.; Rodrigues, C. R.; Castro, H. C.; Louvis, A. R.; Martins, D. L.; Ferreira, V. F. 1,4-naphthoquinones potently inhibiting P2X7 receptor activity. *Eur. J. Med. Chem.* 2018, 143, 1361-1372.
- 298- Thomsen, R.; Christensen, M. H. MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 3315-3321.

APÊNDICE A

Tabela A1 - Valores de comprimento de ligação médio da literatura²⁶⁸

	Ar (C=C)	C=C	C≡N	B-O	B-C
Literatura	1,384	1,331	1,136	1,350	1,580

Tabela A2 - Comprimento de ligação do **NO-01 (65a)**

Ligação	Comprimento (Å)	Ligação	Comprimento (Å)
O1 - B1	1,340(3)	C4 - C5	1,404(3)
O2 - B1	1,366(3)	C5 - C6	1,382(3)
N1 - C9	1,142(3)	C1 - C6	1,385(3)
N2 - C10	1,144(3)	C4 - C7	1,450(3)
C1 - B1	1,576(3)	C7 - C8	1,350(3)
C1 - C2	1,399(3)	C8 - C9	1,433(3)
C2 - C3	1,379(3)	C8 - C10	1,441(3)
C3 - C4	1,396(3)		

Tabela A3 - Comprimento de ligação do **NO-03 (65b)**

Ligação	Comprimento (Å)	Ligação	Comprimento (Å)
O2 - B1	1,357(11)	C3 - C4	1,383(11)
O1 - B1	1,345(12)	C4 - C5	1,385(11)
N1 - C9	1,145(11)	C5 - C6	1,381(11)
N2 - C10	1,131(11)	C3 - C7	1,442(11)
C1 - B1	1,586(12)	C7 - C8	1,356(11)

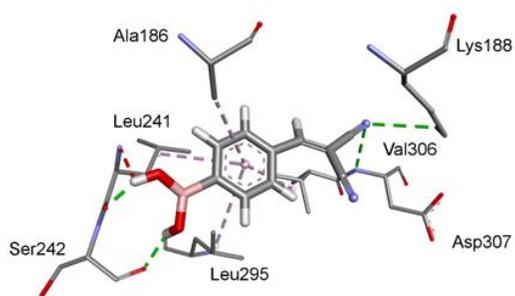
C1 - C2	1,377(11)	C8 - C9	1,426(12)
C1 - C6	1,393(11)	C8 - C10	1,431(12)
C2 - C3	1,398(11)		

Tabela A4 - Comprimento de ligação do NO-12 (65c)

Ligação	Comprimento (Å)	Ligação	Comprimento (Å)
O2 - B1	1,354(3)	C1 - C6	1,402(3)
O1 - B1	1,354(3)	C4 - C7	1,462(3)
N1 - C9	1,144(3)	C7 - C8	1,348(3)
C1 - B1	1,578(3)	C8 - C9	1,427(3)
C1 - C2	1,380(3)	C8 - C10	1,494(3)
C2 - C3	1,385(3)	C10 - O3	1,330(3)
C3 - C4	1,400(3)	C10 - O4	1,197(3)
C4 - C5	1,381(3)	C11 - O3	1,459(2)
C5 - C6	1,388(3)	C11 - C12	1,503(3)

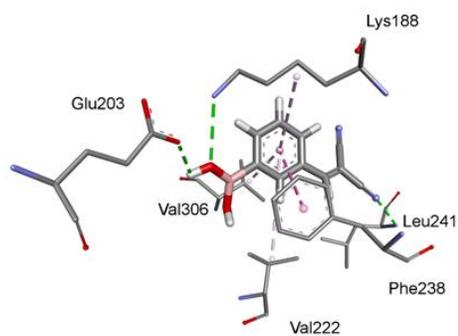
Tabela A5 - Comprimento de ligação do NO-13 (65d)

Ligação	Comprimento (Å)	Ligação	Comprimento (Å)
O2 - B1	1,367(8)	C1 - C6	1,393(8)
O1 - B1	1,349(8)	C3 - C7	1,460(8)
N1 - C9	1,137(8)	C7 - C8	1,347(8)
C1 - B1	1,572(8)	C8 - C9	1,433(8)
C1 - C2	1,393(8)	C8 - C10	1,494(8)
C2 - C3	1,382(8)	C10 - O3	1,313(7)
C3 - C4	1,413(8)	C10 - O4	1,210(7)
C4 - C5	1,382(8)	C11 - O3	1,460(7)
C5 - C6	1,371(8)	C11 - C12	1,495(9)



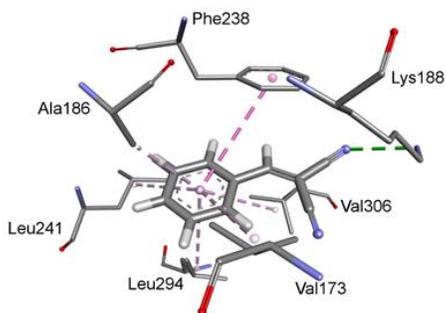
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Pi-Alkyl

Figura A1 - Interações do NO-01 (65a)



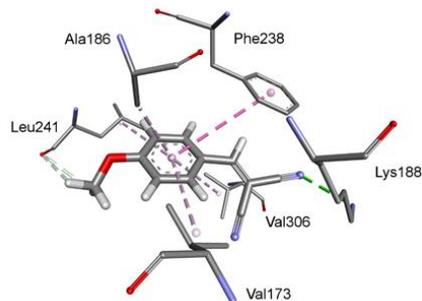
Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Pi-Alkyl
 Pi-Pi Stacked

Figura A2 Interações do NO-03 (65b)



Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Pi-Alkyl
 Pi-Pi Stacked

Figura A3 - Interações do NO-04 (64a)



Interactions
 Conventional Hydrogen Bond
 Pi-Alkyl
 Pi-Pi Stacked
 Carbon Hydrogen Bond

Figura A4 - Interações do NO-05 (64b)

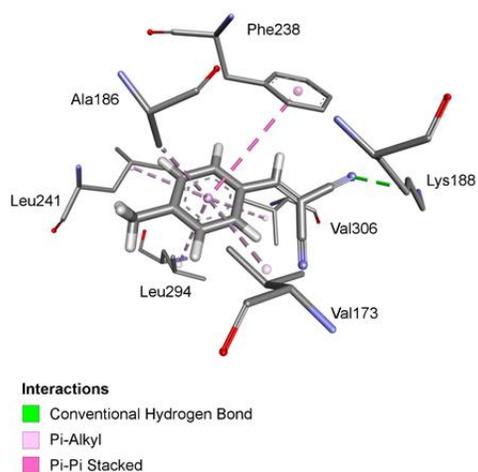


Figura A5 - Interações do NO-06 (64c)

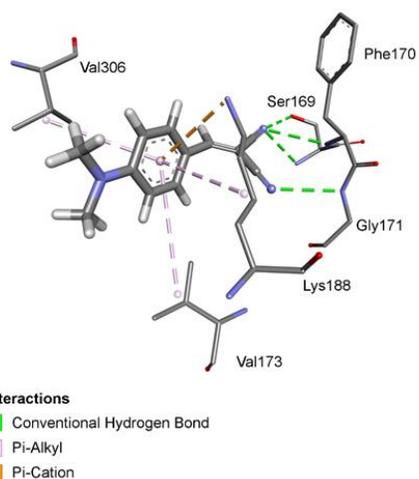


Figura A6 - Interações do NO-07 (64d)

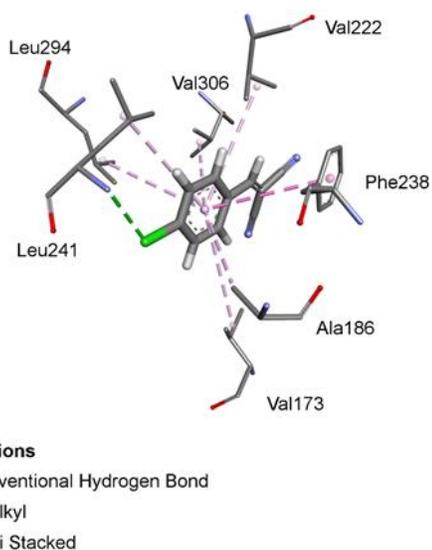


Figura A7 - Interações do NO-08 (64e)

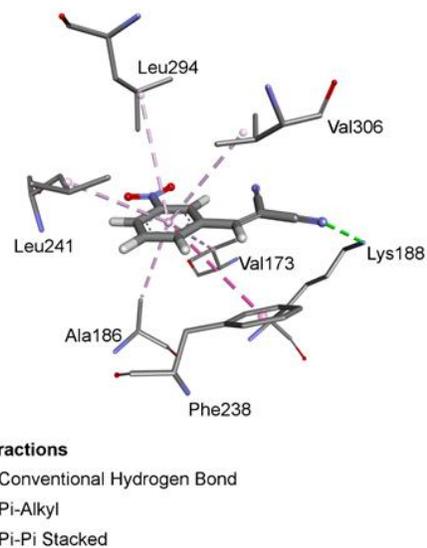
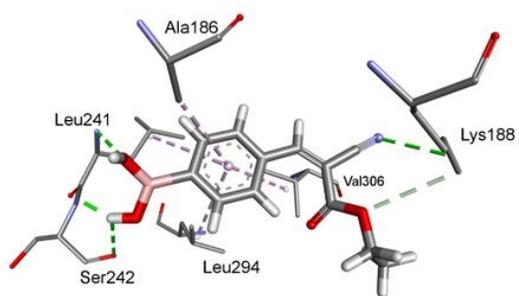


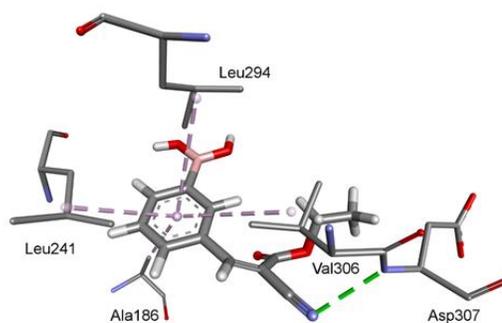
Figura A8 - Interações do NO-11 (64f)



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Alkyl
- Carbon Hydrogen Bond

Figura A9 - Interações do NO-12 (65c)



Interactions

- Conventional Hydrogen Bond
- Pi-Alkyl
- Pi-Pi Stacked

Figura A10 - Interações do NO-13 (65d)

APÊNDICE B

CHEM MED CHEM

CHEMISTRY ENABLING DRUG DISCOVERY

Accepted Article

Title: Synthesis and evaluation of anticancer and trypanocidal activities of boronic tyrophostins

Authors: Daniela Martins, Noemi Hiller, Nayane Silva, Robson Farias, André Souza, Jackson Resende, André Farias, and Nelilma Romeiro

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *ChemMedChem* 10.1002/cmdc.201800206

Link to VoR: <http://dx.doi.org/10.1002/cmdc.201800206>

WILEY-VCH

www.chemmedchem.org



Synthesis and evaluation of anticancer and trypanocidal activities of boronic tyrophostins

Noemi de J. Hiller,^[a] MSc. Nayane A. A. e Silva,^[a] DSc. Robson X. Faria,^[b] DSc. André Luís A. Souza,^[c] DSc. Jackson A. L. C. Resende,^[d] MSc. André Borges Farias,^[e] DSc. Nelilma Correia Romeiro,^[e] DSc. Daniela de Luna Martins*^[a]

[a] Research Group on Catalysis and Synthesis (CSI), Universidade Federal Fluminense, Laboratório 413, Instituto de Química, Campus do Valonguinho, Centro, Niterói, RJ 24020-141, Brazil, dlmartins@id.uff.br (ORCID: 0000-0001-6657-040X)

[b] Laboratory of Toxoplasmosis and other Protozooses – Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Brasil

[c] Laboratory of Biochemistry of Peptides, Oswaldo Cruz Institute (Fiocruz), Brazil.

[d] Laboratory of Solid State Chemistry Universidade Federal do Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Campus Universitário do Araguaia, Barra do Garças – MT, 78600-000, Brazil.

[e] Núcleo de Pesquisas em Ecologia e Desenvolvimento Social (NUPEM), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus de Macaé, Av. Rotary Club s/n; São José do Barreto, Macaé, RJ 27901-000, Brazil.

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

Abstract: Molecules containing the aryl-cyanovinyl moiety are known as tyrophostins because of their action inhibiting proteins from the tyrosine kinase family, an interesting target for the development of anticancer and trypanocidal drugs. In the present work, *E*- (cyanovinyl)benzeneboronic acids were synthesized by Knoevenagel condensations without catalysts, and in water; through a simple protocol that completely avoided the use of organic solvents in the synthesis and in the work-up process. *In vitro* anticancer and trypanocidal activities of the synthesized boronic acids were also evaluated demonstrating that the introduction of the boronic acid functionality can improve the activity of the boronic tyrophostins. *In silico* target fishing using a Chemogenomic approach suggested the tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1a (DYRK1A) as a potential target for some of the designed compounds.

Introduction

Boronic acids are boron organometallics which have a B(OH)₂ unit attached to an organic group (R-B(OH)₂).^[1] Although they were firstly reported in 1860, by Frankland and Duppa,^[2] boronic acids have just gained notoriety after the development of the palladium-catalyzed Suzuki-Miyaura C-C couplings.^[3,4]

Until recently, the application of boronic acids in medicinal chemistry was very restricted to their uses as chemosensors^[5] or as reagents for the synthesis of active molecules.^[6] In 2003, however, bortezomib (Figure 1) was approved for the treatment of people affected by multiple myeloma (MM), a type of blood cancer whose development takes place in the bone marrow.^[7] Bortezomib is marketed as Velcade by Millennium Pharmaceuticals and, according to Global Data, along with lenalidomide, it dominates the MM markets, tending to grow between 2013 and 2023 while being among the top 50 pharmaceutical products by global sales.^[8] The entry of bortezomib into the pharmaceutical market provided the necessary confidence regarding the safety in the use of organoborons as pharmaceuticals and boosted research in both academia and industry for new bioactive boronic acids.^[9]

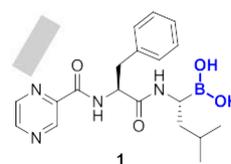
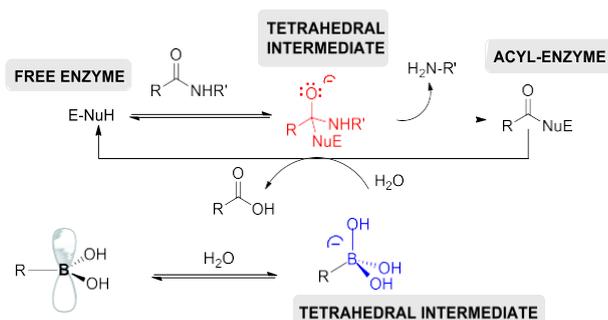


Figure 1. Structure of bortezomib

The expansion of the applicability of boronic acids comes from their unique features which enable the development of antibody mimics in the recognition of biologically relevant sugars and potent enzyme inhibitors. Carbon and boron have many similarities in terms of their structures and electronic aspects, but they are different in terms of reactivity. Therefore, boron mimics carbon in binding processes, but not in the reactivity. This is one of the foundations upon which the construction of protease inhibitors analogues of transition states is based. In the process of amide bond hydrolysis, a trigonal planar (sp²) carbon is transformed into a tetrahedral (sp³) intermediate (Scheme 1A). In boronic acids, boron is trigonal planar (sp²) with an open shell: boron has an empty *p* orbital perpendicular to the attached groups. Depending on the nature of the organic group attached to boron, the pK_a of the arylboronic acids can vary from 4.5 to 8.8. Hence, under physiological conditions, boronic acids can be converted from the neutral and trigonal planar (sp²) to the tetrahedral (sp³) boron (Scheme 1B), what can naturally lead to an analogy with the process of amide bond cleavage by hydrolases in the body (Scheme 1A).

Another important characteristic of boronic acids is their ability to make hydrogen bonds and covalent bonds with Lewis bases, providing an interesting platform for binding to the active centre of enzymes,^[9c] making of the boronic moiety an interesting auxophoric group in the rational drug design.



Scheme 1 - Conversion of the boron atom from sp^2 -hybridized neutral form to sp^3 -hybridized anionic form (analogous to the transition state of hydrolases)^[9,10]

Several arylboronic acids with anticancer activity are reported in the literature.^[11] Combrestatins are *cis*-stilbenes with anticancer properties. Nakamura and his group^[12] have introduced a boronic acid group into the aromatic ring B of combrestatins and obtained boronic combrestatins with an IC_{50} value of $0.0063 \mu\text{M}$ against B-16 cells. These boronic acids inhibited tubulin polymerization *in vitro*. Introduction of $B(OH)_2$ units into the aromatic rings of chalcones has also been successfully used as a strategy to obtain chalcones with anticancer activity.^[13]

Steroid sulfatase (STS) is an enzyme associated to the steroid sulphates metabolism and its inhibition is considered an interesting strategy for the development of anticancer drugs for the cases where the tumor growth depends on estrogen stimulation. Taylor and co-workers^[14] substituted hydroxyls bonded to aromatic rings of known STS inhibitors by a $B(OH)_2$ unit

and observed an increased potency (23-fold higher than the original inhibitors). In this case, the way by which STS was inhibited was also changed.

There are evidences of the implication of EGFR (Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase) in the pathogenesis of several types of carcinoma. Nakamura's group^[15] has introduced a $B(OH)_2$ unit on the aromatic ring of 4-anilinoquinazoline. The resulting boronic acid inhibited EGF-mediated phosphorylation of EGFR tyrosine kinase, as well as presented a prolonged action time which was attributed to the formation of a covalent B-O bond with Asp800 and hydrogen bonds with Asp800 and Cys797. In another work, Nakamura's team substituted the hydroxyl of the tyrosine kinase inhibitor lavendustin, obtaining a boronic acid which selectively inhibited EGFR ($1.0 \mu\text{g/mL}$).^[16]

Several arene vinyl nitriles are referred as members of the typhostins family (**tyrosine phosphorylation inhibitors**) due to their inhibitory effect on the transduction signals via EGFR (epidermal growth factor receptor).^[17] Tyrosine kinases^[18] are involved in the activation of many proteins by signal transduction cascades, when inhibiting protein phosphorylation. Many of the processes involved in the growth, progression, angiogenesis and metastasis of tumors are blocked by the inhibition of receptors of the tyrosine-kinases family. Consequently, kinases have become an important target for cancer therapy.

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) is the etiological agent of Chagas disease, a widespread neglected disease in Latin America. Nifurtimox and benznidazole are two old drugs used in chemotherapy which display several side effects, are effective only in the acute phase and almost ineffective in the chronic cases. Additionally, drug-resistance has been reported for some trypanosome strains.^[19] Therefore, it is of utmost importance to develop new, safer and more efficient drugs for Chaga's disease chemotherapy. Souza and his co-workers^[20] portrayed the importance of tyrosine-kinases in the invasion of *T. cruzi* into primary resident macrophages and they have also found that typhostin 23 (3, Figure 2) inhibited trypanomastigote uptake.

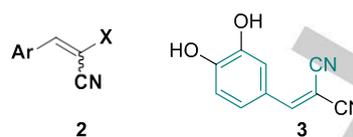


Figure 2 – Structure of arene vinyl nitriles

Considering the potential of aryl-cyanovinyl compounds as anticancer and trypanocidal agents, frequently related to the inhibition of tyrosine kinases; and the anticancer and trypanocidal activity of bortezomib and several arylboronic acids, we decided to attach the boronic moiety to the core structure of aryl-cyanovinyl compounds and evaluate the effect of this hybridization into the anticancer and trypanocidal activities of the resulting compounds. Additionally, a target fishing study was performed with the aim of investigating the binding potential of the aryl-cyanovinyl towards tyrosine kinases and docking studies were conducted as well to hypothesize their binding mode with the potential targets.

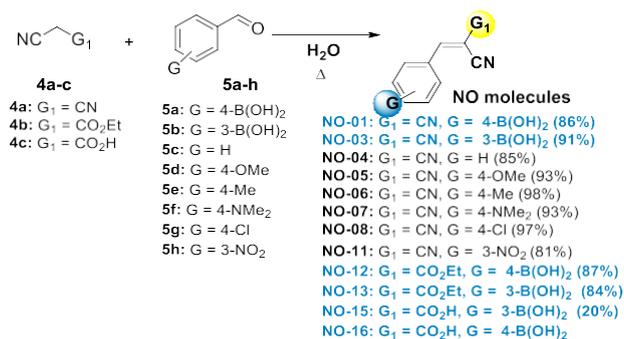
Results and Discussion

Knoevenagel condensations

Knoevenagel condensation^[21, 22] is traditionally performed in the presence of catalysts such as amines (aromatic or aliphatic), ammonium salts, or alkali metal hydroxides in organic solvents.^[23] Although the solventless mechanochemical approach is useful for the active reagents, organic solvents are employed to remove the products from the reaction mixtures.^[24]

In the 1980s, Breslow^[25] demonstrated that hydrophobic effects could greatly enhance the rate of organic reactions carried out in aqueous medium. Recently, in order to solve the drawbacks associated with the use of water as reaction medium, such as hydrolysis or decomposition, experimental procedures included the employment of surfactants, benign co-solvents, and microwave or ultrasound irradiation. The applications of aqueous chemistry protocols are highly desirable since water is cheap, non-flammable, nontoxic and plentifully available. Therefore, the use of water in organic synthesis has attracted a great deal of attention. Furthermore, it has already been shown that water is an interesting solvent for Knoevenagel condensations.^[26]

In the present work, aryl-cyanovinyl compounds were prepared by Knoevenagel condensation between aromatic aldehydes and nitriles containing active methylene (Scheme 2) in aqueous conditions.^[27] The aryl-cyanovinyl compounds containing the boronic moiety were prepared using the corresponding formylbenzeneboronic acids. Although boronic acids are the main focus of the present work, other cyanovinylbenzenes were also prepared for comparison, with the aim of evaluating the role of boronic acids in the biological activities as well as the effect of the boronic moiety on the properties of the cyanovinyl compounds. Reaction yields are outlined in Scheme 2.



Scheme 2. Synthesis of aryl-cyanovinyl compounds

Aryl-cyanovinyl compounds were obtained, without using any catalyst or organic solvent, in high yields with a simple, environmentally benign and efficient aqueous protocol where products crashed out from the reaction mixture and were isolated by vacuum filtration followed by washing with cold water. Formylbenzeneboronic acids were stable in the reaction conditions and no oxidation of the aldehydes to the corresponding carboxylic acids was observed. Hydrolysis of the ethyl esters was not observed.

Although other Knoevenagel aqueous protocols have already been reported, it is important to highlight that boronic acids were not evaluated in the previous works. Arylboronic acids can undergo protodeboronations^[28] in aqueous conditions which results into undesirable products in Suzuki cross-couplings and pH of the reaction mixture can influence the rate of the C-B bond break. In the present work, high yields were achieved using the aqueous protocols in Knoevenagel with malononitrile and ethyl cyanoacetic acid. In these cases, no deboronation has been detected.^[29]

Under the conditions employed in the present work, products crashed out from the reaction mixture, being obtained in high purity by filtration (>98% by NMR, aldehyde the unique contaminant). Tedious separation of the products is common for Knoevenagel reactions under classic conditions using organic solvents and organic bases. Boronic acids, because of their polar B(OH)₂ units, are highly retained by silica in column chromatography purification. Besides that, boroxines (oligomeric anhydrides produced by dehydration) can be formed using organic solvents like toluene or acetonitrile under reflux, or in the process of removing these solvents by distillation. Therefore, usage of the aqueous protocol reported in the present work resulted only in boronic acids instead of the corresponding anhydrides or a mixture between the acids and the anhydrides.

Excess of malononitrile or cyanoacetate was not necessary. When malononitrile was employed in excess, a yellow unidentified byproduct was generated which was difficult to remove from the boronic products by recrystallization and with a retention factor near to the product in silica TLC plates.

In the case of the derivatives of ethylcyanoacetate or cyanoacetic acid (entries 9-11), although it is possible to obtain diastereoisomers *E* and *Z*, only one diastereoisomer (*E*) was detected in the ¹H-NMR spectrum. The assignment of the *E* configuration by NMR was confirmed by X-ray diffraction of single crystal (Figure 3), Figures S1-S3 – Supplementary material).

For biological tests, products were subjected to recrystallization in ethanol/water or acetone/water mixtures.

It was not possible to obtain the cyanovinyl product (**NO-16**) from the reaction between 4-formylbenzeneboronic acid and the cyanoacetic acid and low reaction yield was achieved for the product (**NO-15**) of the reaction of 3-formylbenzeneboronic acid with the cyanoacetic acid (entry 11). Other reaction conditions were applied^[30,31] in the attempt to obtain **NO-15** and **NO-16**, but they were not successful as

well.

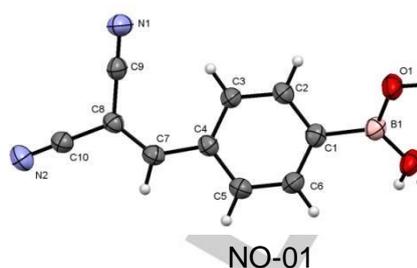


Figure 3 – ORTEP representations (50% probability ellipsoids) of the molecular structure of the boronic acid **NO-01**

Target Fishing using a Chemogenomics Approach

In an effort to provide additional support to the potential binding of aryl-cyanovinyl compounds to tyrosine kinases we have performed Chemogenomics studies, which have been successfully applied in a variety of *in silico* target fishing approaches.^{[32], [33]} The results showed a few potential targets belonging to the large protein kinase family, among others (Supplementary Material). One of the targets that have been suggested for the designed compounds, including **NO-01** and **NO-03**, was dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1a (DYRK1A). This tyrosine kinase belongs to the dual specificity tyrosine (Y) phosphorylation regulated kinase (DYRK) family which is known to be activated through autophosphorylation of tyrosine residues in the activation loop and that phosphorylates their substrates on serine and threonine residues.^[34] In addition, its role in cancer has been investigated by a number of groups,^[35] and its action on EGFR signaling regulation has been highlighted.^[36] Although it is true that chemogenomics results depend on the molecular scaffolds originally used to classify the ligands into their protein targets and that this influences the prediction results in target fishing of molecules not yet tested for their isolated targets, they give us extra support to the original design idea behind the set of molecules presented in this work.

Molecular Docking

In order to try to hypothesize the binding mode of the designed compounds with tyrosine kinases, we have selected DYRK1A to perform docking studies. ChemPLP function generated rmsd values in the redocking of co-crystallized ligands below 0.5 Å and thus was chosen for this study (data not labelled). Figure 4 shows NO-01, a representative of the planned boronic acid compounds, in the active site of DYRK1A. The theoretical binding pose of NO-01 shows hydrogen bond interactions of the cyanovinyl groups with LYS188 and with the –NH group of the backbone of ASP307, which belongs to the catalytic triad (DFG). Also, NO-01 makes hydrogen bonds involving the boronic acid function, the –NH group of LEU242 and the side chain of SER242. Finally, Van der Waals interactions involving the aromatic ring of NO-01, VAL173 LEU241, LEU294 and PHE238 in the active site can be suggested (Figure 8). It is worth of note that the studied compounds present, in general, a similar putative binding mode, in spite of the structural differences (Supplementary Material S23-S36).

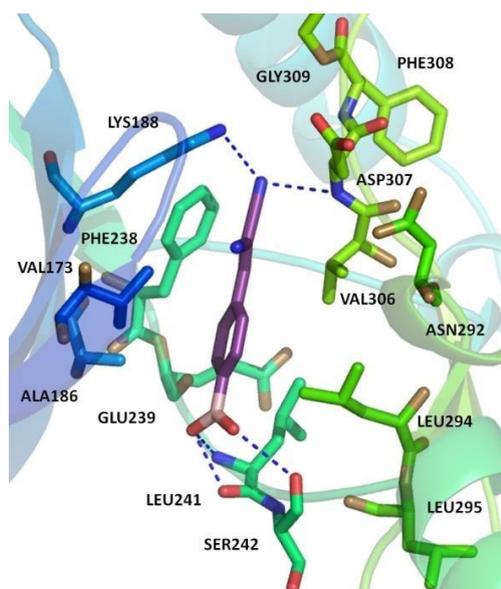


Figure 4 – Putative binding pose between NO-01 and DYRK1A as suggested by docking studies. Hydrogen atoms have been omitted for clarity. Hydrogen bonds are shown in blue dashed lines.

Biological assays

Aryl-cyanovinyl compounds with different substitution patterns on the aromatic rings were evaluated with respect to their anticancer and trypanocidal activity in order to compare and to investigate the effect of the introduction of the $B(OH)_2$ moiety into the so-called tyrophostins. In addition, the toxicity of the compounds in mammalian cell lines was also checked out.

Toxicity assay in mammalian primary cell lines

Vinyl nitriles-induced injuries to mice primary peritoneal macrophages were tested in terms of the capacity of decreasing resazurin. Viable cells whose metabolism is active are capable of reducing resazurin (blue and weakly fluorescent) into resofurin (pink and high fluorescent). The number of viable cells present in the sample can be quantified since it is proportional to the resofurin produced. None of the vinyl nitriles displayed toxicity at the concentration of 100 μ M, when tested against wild primary mice peritoneal cells for 72 h (Table 1). The macrophagic cell line J774.G8 was also insensitive to the treatment with the vinyl nitriles (Table 1). Rat GH3 derived from pituitary tumor cell line was partially affected by **NO-04** ($G_1 = CN$, $G = H$) derivative with resazurin reduction of 50%. The derivatives **NO-11** ($G_1 = CN$, $G = 3-NO_2$) and **NO-12** ($G_1 = CO_2Et$, $G = 4-B(OH)_2$) were more effective reducing the proliferation in 23.56 % and 32.87 %, respectively (Table 1). None of the other NO derivatives damaged the proliferative activity of GH3 cells. With respect to the human cell line U937, obtained from histiocytic lymphoma, four NO derivatives: **NO-05** ($G_1 = CN$, $G = 4-OMe$), **NO-06** ($G_1 = CN$, $G = 4-Me$), **NO-11** ($G_1 = CN$, $G = 3-NO_2$), and **NO-13** ($G_1 = CO_2Et$, $G = 3-B(OH)_2$), displayed potent effects, resulting in a decrease of the cell viability in more than 80% (Table 1).

Table 1 – Antiproliferative effects of vinyl nitriles

Treatments	% proliferation after 72 h			
	Peritoneal Macrophages ^a	J774.G8 cells	GH3 cells	U937 cells
No treated cells	100.38 ± 0.4	99.81 ± 0.13	110.58 ± 0.05	95.43 ± 1.65
0.1% Triton X-100	12.77 ± 1.01	16.64 ± 1.18	14.40 ± 2.5	13.07 ± 2.22
NO-01^a	99.51 ± 0.33	100.44 ± 0.11	100.07 ± 0.4	98.10 ± 1.04
NO-03^a	100.05 ± 0.12	99.70 ± 0.07	99.80 ± 0.3	96.31 ± 1.33
NO-04^a	99.35 ± 0.56	102.68 ± 0.03	50.13 ± 3.5	91.01 ± 3.08
NO-05^a	105.75 ± 0.1	100.65 ± 0.06	99.40 ± 1.09	17.87 ± 2.79
NO-06^a	99.69 ± 0.06	102.53 ± 0.05	93.28 ± 1.88	16.28 ± 1.36
NO-07^a	100.43 ± 1.26	94.65 ± 0.08	99.78 ± 0.8	92.01 ± 2.8
NO-08^a	100.52 ± 0.47	100.25 ± 0.02	97.75 ± 0.06	97.23 ± 1.51
NO-11^a	99.59 ± 0.22	100.23 ± 0.15	23.56 ± 2.11	14.29 ± 3.32
NO-12^a	99.37 ± 0.71	99.93 ± 0.44	32.87 ± 1.93	82.95 ± 3.71
NO-13^a	99.38 ± 0.46	98.95 ± 0.2	100.20 ± 0.99	18.95 ± 0.52

^a[NO] = 100 \square M. Vinyl nitriles-induced injury. Mice peritoneal macrophages, murine J774.G8 cells, rat GH3 cells and human U937 cells were treated with the compounds NO (100 \square M) for 72 h. Cytotoxicity was measured using resazurin reduction to resofurin as a proliferation index. Data shown are mean \square SD of four independent experiments.

The derivatives with action against GH3 and U937 cells were tested in increasing doses for 72 h of exposition. We tested these substances in peritoneal macrophages as a health control. The derivatives **NO-04** and **NO-11** and **NO-12**, added in the presence of GH3 cells, gave IC₅₀ values of 0.29 ± 0.01 μ M, 0.12 ± 0.06 μ M and 0.14 ± 0.09 μ M, respectively (Table 2). The boronic acid **NO-12** ($G_1 = CO_2Et$, $G = 4-B(OH)_2$), was extremely potent against GH3 cells (IC₅₀ = 90 nM). Similarly, the nitrated compound **NO-11** exhibited potency comparable to **NO-12**. Although the compound **NO-04** ($G_1 = CN$, $G = H$), whose aromatic ring has no substituents, also reached high efficiency, with action in nanomolar concentration; its effect was inferior compared to the nitro-substituted **NO-11** and the boronic acid **NO-12**. These data suggest that hydrogen bonding donor or acceptor groups are important for the molecular recognition of these compounds. These results revealed boronic acids as relevant candidates to develop molecules against the pituitary tumor. In relation to the human U937 cells, **NO-05**, **NO-06**, **NO-11** and **NO-13** exhibited IC₅₀ values of 0.88 ± 0.02 μ M, 0.69 ± 0.07 μ M, 0.47 ± 0.08 μ M and 9.83 ± 1.07 μ M, respectively (Table 2). The efficacies of **NO-05** ($G_1 = CN$, $G = 4-OMe$), **NO-06** ($G_1 = CN$, $G = 4-Me$) and **NO-11** ($G_1 = CN$, $G = 3-NO_2$) were similar. Albeit the boronic acid **NO-13** ($G_1 = CO_2Et$, $G = 3-B(OH)_2$), has demonstrated lower potency than **NO-05**, **06** and **11**, its effect indicates a potential to develop new boronic acids based upon this structure. As we can observe from the Table 2 data, the IC₅₀ values in peritoneal macrophages were 60 to 2270 times superior to that of the cancer lineages depending on the derivative evaluated. Surprisingly, only the derivative **NO-11** acted on rat GH3 and human U937 cell pointing to a hypothetical general mechanism of action. In addition, this derivative was the most potent in both cell lines (Table 2). In contrast, the primary cell was extremely resistant to **NO-11** toxicity when compared to the cancer lineages. **NO-04** and **NO-12** exhibited selectivity for GH3 cells possibly acting on EGFR or Ras signaling.^[37] **NO-05** and **NO-06** were potent to inhibit U937 growth. Although **NO-13** was not the most potent, this derivative demonstrated selectivity for U937 cell lineage. This cell type express EGFR,^[38a] FES tyrosine kinase^[38b] and Syk protein tyrosine kinase, enzymes that can be targets for **NO-05**, **06** and **13**.

Table 2 – Dose-response effects of vinylnitriles against mammalian cells proliferation

	Peritoneal macrophages IC ₅₀ (μM)	GH3 cells IC ₅₀ (μM)	U937 cells IC ₅₀ (μM)
NO-04	99.63 ± 8.54	0.29 ± 0.01	-
NO-05	147.77 ± 14.73	-	0.88 ± 0.02
NO-06	41.87 ± 8.76	-	0.69 ± 0.07
NO-11	372.31 ± 11.08	0.12 ± 0.06	0.47 ± 0.08
NO-12	387.87 ± 7.28	0.14 ± 0.09	-
NO-13	78.91 ± 6.45	-	9.83 ± 1.07

Nitrile analogues dose response relationship. Rat GH3 cells were treated with the compounds NO-4, NO-11 and NO-12. U937 cells were treated with NO-5, NO-6, NO-11 and NO-13. Peritoneal macrophages were treated with all NO derivatives above. For all cell types tested, the concentrations tested range from 1 nM to 10 mM for 72 h. Cytotoxicity was measured using resazurin reduction to resorufin as a proliferative index. Data shown are mean ± SD of four independent experiments.

Boronic acids may inhibit kinases associated to cancer migration, generally associated to EGFR activation.^[39] Thus, this prominent activity observed for the boronic acid **NO-12** may be due to a possible proliferation inhibition via EGFR, as previously demonstrated in GH3 cells^[40] and U937 cells.^[41] The absence of activity observed for the mice peritoneal macrophages may be associated to a distinct EGFR function or signalling regulation in this cell type.^[42]

In vitro antiparasitic activity

The aryl-cyanovinyl compounds were investigated regarding their effect on *in vitro* cultures of epimastigotes of *T. cruzi* in comparison with benznidazole. Y strain was treated for 72 h with 100 μM solution of the cyanovinyl derivatives and its viability was quantified by the MTT assay. Triton X-100 (0.1%) and benznidazole (100 μM) were the positive controls to reduce trypanosomes viability. No treated epimastigote forms were considered as negative control. **NO-03** (G₁ = CN, G = 3-B(OH)₂), **NO-04** (G₁ = CN, G = H), **NO-12** (G₁ = CO₂Et, G = 4-B(OH)₂) and **NO-13** (G₁ = CO₂Et, G = 3-B(OH)₂) reduced trypanosome viability with similar statistical significance, but **NO-12** was the most potent derivative with action similar to the positive control and benznidazole treatment (Figure 9). **NO-05** and **NO-06** derivatives diminished *T. cruzi* survival with a minor efficacy than the previous **NO-03**, **NO-04**, **NO-12** and **NO-13** derivatives.

Dose-response curves were obtained after cells were exposed to the vinylnitriles for 24 h. The EC₅₀ values achieved for **NO-03**, **NO-04**, **NO-05**, **NO-06**, **NO-12** and **NO-13** were 14.5 μM; 10.2 μM; 530.6 μM; 508.4 μM; 0.795 μM and 78.4 μM, respectively (Figure 6). Among the molecules tested, **NO-12** showed a nanomolar potency that resulted in *T. cruzi* death. Other boronic acids, like **NO-03** and **NO-13** also exhibited good effects, albeit in less potency than **NO-12**, and with **NO-13** presenting better performance than **NO-03**. These results indicate boronic acids as effective platforms upon which new molecules with improved actions against *T. cruzi* can be designed. Also, it seems that the mechanism of action is more favoured with *para*-substituted boronic acids with ester-substituted vinylnitriles. The EC₅₀ value measured for **NO-12** (0.795 μM) was more than 10 times superior to the EC₅₀ described for benznidazole^[43] and more than 4 times superior to the EC₅₀ of nifurtimox,^[44] both drugs used in the current therapy of Chagas disease. The boronic acid **NO-12** exhibited lower potency than bortezomib^[45] and DDD85646, both strong proteasome inhibitors with trypanocidal activity against *T. brucei*.^[46] A possible reason for this may be attributed to the difference between the trypanosome strains and/or to a

different mechanism of action. Considering the observed trypanocidal activities of some boronic acids synthesized in the present work, especially that of the **NO-12**, it is necessary to highlight the potentiality of the vinylnitriles containing the boronic acid moiety as a new avenue for the development of new drugs with trypanocidal action.

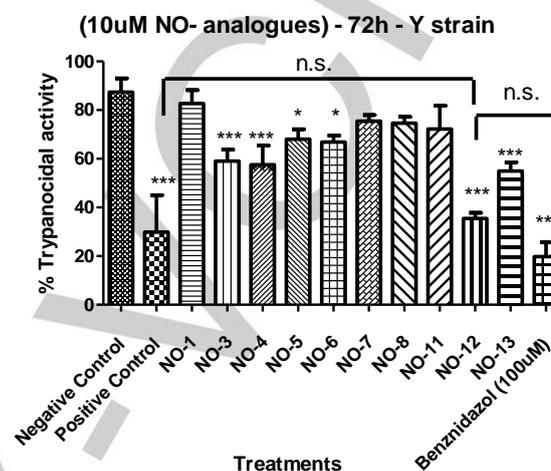


Figure 9. Trypanocidal activity (72 h, [vinylnitriles] = 100 μM, Y strain, n=3). Graphic representative of triplicate treatments in 4 distinct days. ***p < 0.01 relative to negative control, *p < 0.05 relative to negative control; n.s. no statistical difference in relation to positive control or benznidazole.

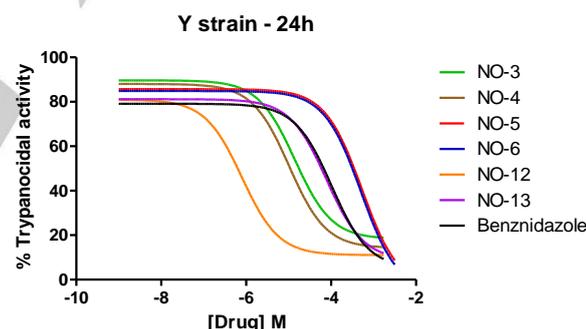
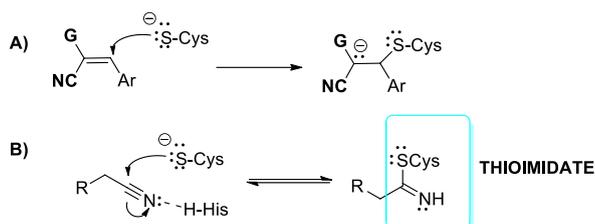


Figure 10. Trypanocidal activity in 72 h (100 μM vinylnitriles, n=3, Y strain). This graph is representative of triplicate treatments in 4 distinct days. *** p<0.01 in relation to negative control, * p<0.05 in relation to negative control; n.s. no statistical difference in relation to positive control or benznidazole.

It is interesting to note that, in the case of trypanocidal activity, most of the tyrothostins that showed activity contain the B(OH)₂ unit in their structure. Although the rationale of the work was based on the possible inhibitory action against tyrosine kinases, other important targets for *T. cruzi* may also be involved. Since the annotation of the *T. cruzi* genome (2004), proteases have emerged as potential drug targets because of the important roles they have in the protozoa metabolic pathways.^[47] Serine proteases are involved in host cell invasion. Metallopeptidases and proteasome (threonine proteases) also correlates with the parasite's virulence.^[46b] Arylboronic acids, due the characteristics mentioned before, mimics the transition states of serine and threonine proteases since boron binds strongly to oxygen nucleophiles as serine and threonine residues.^[49] There are several reports about the inhibition of proteases by arylboronic acids and other classes of boron compounds.^[49a]

Cruzain is a cysteine protease with essential action for virulence of *T. cruzi* and which are present in all stages of life of the parasite. Cruzain is considered an important target for the development of antichagasic agents.^[50] It is known that

Michael acceptors, such as vinyl sulphones, for example, are irreversible inhibitors of this protease. In addition, compound K777 is a Michael acceptor in the preclinical stage.^[51] Typhostins also belong to the Michael acceptor class and in this case, the thiol group present on the active site of cruzain can attack the vinylic carbon with formation of a S-C bond between the enzyme and the inhibitor (Scheme 3A). Dipeptidyl nitriles, for example, are inhibitors of cysteine proteases which contain a nitrile as warhead. In this case, the attack of the thiol group present in the active site of the enzyme interacts with the nitrile group resulting in a thioimide intermediate (Scheme 3B). Dipeptidyl nitriles are known reversible inhibitors of cruzain.^[52] Therefore, the nitrile group of the typhostins can, in principle, be a point of interaction with cruzain.



Scheme 3 – Possible interactions between typhostins and cruzain

Differently from what occurs with serine and threonine proteases, boronic acids are not considered transition state analogue inhibitors of cysteine proteases of the papain family such as cruzain.^[53] According to our results, however, the boronic acids presented better profile than the typhostins that did not contain the boronic group in their structure. In this case, we hypothesize that, if cruzain is a target for the boronic typhostins prepared in the present work, the boronic acid should act as an auxophoric group.

In future works, our group intends to better investigate the probable targets for these boronic acids in order to design optimized new compounds by taking **NO-01**, **03** and **12** as prototypes.

Conclusions

Knoevenagel condensations under aqueous conditions were found to be an excellent protocol to obtain benzenevinyl nitriles containing the boronic acid unit in high purity levels, since organic solvents were completely avoided, also in the work-up procedure. *E*-aryl-cyanovinyl compounds were obtained in high yields (81–98%), except for the derivative of the cyanoacetic acid **NO-15** (20%). Four of the five benzenevinyl nitriles containing the boronic acid unit crystallized as single-crystals. The hybridization strategy of the boronic acid and typhostins in the same molecular structure resulted in good biological activities. **NO-12** (G1 = CO₂Et and G = 4-B(OH)₂) exhibited high antiproliferative potential (0.14 ± 0.09 μM) against cell lines GH3, from rat pituitary tumor. **NO-13** (G1 = CO₂Et and G = 3-B(OH)₂); although with a smaller potency in comparison to the 4-methoxy, 4-methyl and 3-nitro-substituted compounds, also displayed antiproliferative activity against the human leukemic monocyte lymphoma cell line U937. Three of the boronic acids (**NO-03**, **NO-12** and **NO-13**) displayed antichagasic *in vitro* activity, with the compound **NO-12** showing an EC₅₀ value (0.795 μM) ten times lower than benznidazole (EC₅₀ = 40 μM), the current drug employed in the chemotherapy of Chagas disease. Chemogenomics studies reinforced our expectations that kinases might be the targets of some of these compounds in cancer cell lines. Docking studies with DYRK1A, a phosphorylation regulated

kinase, indicated that the boronic acid-containing compounds such as **NO-01**, **NO-03** and **NO-12** can bind to the active site of this protein. Further investigations will be conducted to understand which targets of boronic typhostins are responsible for the trypanocidal activities found, in order to better plan new boronic acids using the NO series as prototypes.

Experimental Section

Chemicals were purchased from Sigma Aldrich and Boron Molecular and used without further purification. The synthesized products were characterized by analysis of their spectral data (FT-IR and NMR) and by X-ray diffraction. Infrared spectra were measured using KBr pellets on a Varian FT-IR 660 spectrophotometer. ¹H (500 or 300 MHz) and ¹³C (125 or 75 MHz) spectra were recorded on a Varian VNMRS spectrometer in DMSO-D₆ or CDCl₃ solution. The chemical shift data are reported in units of δ (ppm), in the case of CDCl₃, the peaks appear downfield from tetramethylsilane, which was used as an internal standard. Coupling constants (J) are reported in Hertz and refer to apparent peak multiplicities. The single-crystal X-Ray diffraction data were collected on a Bruker D8-Venture X-ray single-crystal diffractometer equipped with a CMOS PHOTON100 using 1 μS microfocus MoKα (λ = 0,71073 Å) X-ray radiation. APEX2 software^[54] were used to collect, reduce and integrate the data. Using the SAINT software, the final unit-cell parameters were determined and refined and the data was integrated. Absorption correction was performed by a multi-scan method implemented in SADABS.^[55] The structures were solved by the direct methods and were refined using full-matrix least-square methods on Fo2 using the SHELX package.^[56] All non-H atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms were placed in geometrically calculated positions and refined using riding model. The reaction monitoring was accomplished by TLC (thin-layer chromatography) on silica gel plates (Silicycle, 250 μm, F-254) and the plots were visualized using UV light or iodine vapors. Melting points were recorded on a Fisatom 413D apparatus.

Typical Knoevenagel procedure – In a rounded-bottom flask were added: active methylene containing compound (2 mmol), aldehyde (2 mmol) and distilled water (10 mL). The reaction mixture was magnetically stirred at 80° C (oil bath) for 2.5–4.5 h. After the completion of the reaction (TLC), the reaction mixture was cooled to room temperature, then it was vacuum filtered and the solid obtained was washed with cold water and dried under air. Boronic acid containing cyanovinyl moieties were obtained in yields ranging from 84–91% as a mean of triplicates.

(4-(2,2-dicyanovinyl)phenyl)boronic acid (NO-01): Product was obtained according to the typical procedure in 2.5 h, as white solid in 86% yield (decomposes 301° C). δH (500 MHz; DMSO-d₆; J in Hz) 8.52 (1H, s), 8.33 (2H, s), 7.98–7.95 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.90–7.88 (2H, d, J = 8.3 Hz). δC (75 MHz; DMSO-d₆) 161.5, 134.6, 132.3, 129.2, 114.1, 113.1, 81.8. IR (KBr) ν_{max}/cm⁻¹ 1344 (B-O), 1590 (C-C), 2228 (C≡N), 2245 (C≡N), 3356 (OH, ν_s), 3434 (OH, ν_{as}).

Crystallographic data for NO-01: C₁₀H₇N₂O₂B, M = 197.99, colorless block, size 0.75 × 0.29 × 0.07 mm³, T = 293(2) K, Monoclinic, space group C₂/c, a = 11.1500(8) Å, b = 10.0434(9) Å, c = 17.1086 (15) Å, β = 92.084 (3)°, V = 1914.6 (3) Å³, Z = 8, D_c = 1.374 g/cm³, μ = 0.096 mm⁻¹, F(000) = 816, 11056 reflections measured, 1746 independent, with R_{int} = 0.079; 142 parameters; Final agreement factors: R₁ = 0.064 [F² > 2σ(F²)], wR₂ = 0.1694 and GOOF = 1.081. Deposition Number CCDC: 1527385.

(3-(2,2-dicyanovinyl)phenyl)boronic acid (NO-03): Product was obtained according to the typical procedure in 2.5 h, as a white solid in 91% yield (m.p. 265–268 °C). δ H (300 MHz; DMSO- d_6 ; J in Hz) 8.52 (1H, s), 8.31 (1H, s), 8.26 (1H, s), 8.08–8.05 (2H, d, J = 7.4 Hz), 8.01–7.99 (2H, d, J = 7.9 Hz), 7.58 (1H, t, J = 7.6 Hz). δ C (75 MHz; DMSO- d_6) 162.0, 139.7, 136.7, 131.4, 130.5, 128.5, 114.2, 113.1, 81.1. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1357 (B-O), 1576 (C-C), 1597 (C-C), 2227 (C \equiv N), 2247 (C \equiv N), 3318 (OH, ν_s), 3402 (OH, ν_{as}).

Crystallographic data for NO-03: C₁₀H₇N₂O₂B.H₂O, M = 216.00, colorless block, size 0.22 × 0.07 × 0.06 mm³, T = 293(2) K, Triclinic, space group P-1, a = 3.752(3) Å, b = 10.113(7) Å, c = 14.374(9) Å, α = 104.08 (2)°, β = 96.26 (2)°, γ = 94.47 (2)° V = 522.8 (3) Å³, Z = 2, D_c = 1.372 g/cm³, μ = 0.101 mm⁻¹, F(000) = 224, 9500 reflections measured, 1903 independent, with R_{int} = 0.1204; 150 parameters; Final agreement factors: R₁ = 0.1304 [F² > 2 σ (F²)], wR₂ = 0.3723 and GOOF = 1.227. Deposition Number CCDC: 1527386.

2-benzylidenemalononitrile (NO-04): Product was obtained according to the typical procedure in 4 h, as white solid in 85% yield (m.p. 82–84 °C). δ H (500 MHz; CDCl₃; J in Hz) 7.92–7.90 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.78 (1H, s), 7.65–7.62 (1H, t, J = 7.5 Hz), 7.56–7.53 (2H, t, J = 7.8 Hz). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1450–1568 (C=C Ar), 2224 (C \equiv N), 3037 (sp²C-H).^[57]

2-(4-methoxybenzylidene)malononitrile (NO-05): Product was obtained according to the typical procedure in 4 h, as a yellow solid in 90% yield (m.p. 116–118 °C). δ H (500 MHz; CDCl₃; J in Hz) 7.92–7.90 (2H, d, J = 8.9 Hz), 7.65 (1H, s), 7.02–7.01 (2H, d, J = 9 Hz), 3.92 (3H, s). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1195 (C-O), 1513–1605 (C=C Ar), 2224 (C \equiv N), 2854 (sp³C-H), 3025 (sp²C-H).^[58]

2-(4-methylbenzylidene)malononitrile (NO-06): Product was obtained according to the typical procedure in 2 h, as white solid in 98% yield (m.p. 136–137 °C). δ H (300 MHz; CDCl₃; J in Hz) 7.83–7.80 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.72 (1H, s), 7.35–7.32 (2H, d, J = 8.1 Hz), 2.45 (3H, s). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1413–1589 (C=C Ar), 1605 (C=C), 2225 (C \equiv N).^[59]

2-(4-(dimethylamino)benzylidene)malononitrile (NO-07): Product was obtained according to the typical procedure in 5 h, as an orange solid in 93% yield (m.p. 185–188 °C). δ H (300 MHz; CDCl₃; J in Hz) 7.83–7.79 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.46 (1H, s), 6.71–6.67 (2H, d, J = 9.2 Hz), 3.14 (6H, s). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1388, 1360 (C-N), 1614 (C=C), 2209 (C \equiv N).^[58]

2-(4-chlorobenzylidene)malononitrile (NO-08): Product was obtained according to the typical procedure in 4 h, as a white solid in 97% yield (m.p. 167–169 °C). δ H (300 MHz; CDCl₃; J in Hz) 7.87–7.84 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.73 (1H, s), 7.54–7.50 (2H, d, J = 8.6 Hz). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1095 (Ar-Cl), 1409–1595 (C=C Ar), 2229 (C \equiv N).^{[58a], [59]}

2-(3-nitrobenzylidene)malononitrile (NO-11): Product was obtained according to the typical procedure in 4 h, as a white solid in 81% yield (m.p. 104–106 °C). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1356, 1528 (N-O), 1596 (C=C), 2226 (C \equiv N). δ H (300 MHz; CDCl₃; J in Hz) 8.67–8.65 (1H, m), 8.49–8.45 (1H, ddd, J = 8.3, 2.1, 0.9 Hz), 8.34–8.31 (1H, dt, J = 8.0, 0.7 Hz), 7.89 (1H, s), 7.82–7.76 (1H, t, J = 8.1 Hz). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1095 (Ar-Cl), 1409–1595 (C=C Ar), 2229 (C \equiv N).^{[53b], [54a]}

(E)-(4-(2-cyano-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)boronic acid (NO-12): Product was obtained according to the typical procedure in 3.5 h, as a white solid in 84% yield (decomposes 242–243 °C). δ H (300 MHz; DMSO- d_6 ; J in Hz) 8.37 (1H, s), 8.29 (2H, s), 7.99–7.97 (2H, d, J = 8.4 Hz), 7.95–7.92 (2H, d, J = 8.4 Hz), 4.36–4.29 (2H, q, J = 7.1 Hz), 1.33–1.29 (3H, t, J = 7.1 Hz). δ C (75 MHz; DMSO- d_6) 161.7, 155.0, 134.5, 132.5, 129.5, 115.5, 102.9, 62.3, 13.91. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1259 (O-C-C), 1336 (C-C(=O)-O), 1609 (C-C), 1723 (C=O), 2239 (C \equiv N), 3363 (OH, ν_s), 3401 (OH, ν_{as}).

Crystallographic data for NO-12: C₁₂H₁₂NO₄B, M = 245.04, colorless block, size 0.55 × 0.23 × 0.19 mm³, T = 293(2) K, Triclinic, space group P-1, a = 7.5728(12) Å, b = 7.7133(9) Å, c = 11.3320(18) Å, α = 97.625 (3)°, β = 93.4877 (4)°, γ = 112.06 (6)° V = 603.62(15) Å³, Z = 2, D_c = 1.348 g/cm³, μ = 0.100 mm⁻¹, F(000) = 512, 5898 reflections measured, 2097 independent, with R_{int} = 0.0369; 165 parameters; Final agreement factors: R₁ = 0.0447 [F² > 2 σ (F²)], wR₂ = 0.1228 and GOOF = 1.038. Deposition Number CCDC: 1527387

(E)-(3-(2-cyano-3-ethoxy-3-oxoprop-1-en-1-yl)phenyl)boronic acid (NO-13): Product was obtained according to the typical procedure in 4.5 h, as a white solid in 87% yield (m.p. 202–206 °C). δ H (300 MHz; DMSO- d_6 ; J in Hz) 8.36 (2H, s), 8.21 (2H, s), 8.11–8.09 (1H, d, J = 7.9 Hz), 8.02–8.01 (1H, d, J = 7.4 Hz), 7.58–7.54 (1H, t, J = 7.6 Hz), 4.36–4.29 (2H, q, J = 7.1 Hz), 1.34–1.29 (3H, t, J = 7.1 Hz). δ C (75 MHz; DMSO- d_6) 161.8, 155.5, 138.8, 137.1, 131.6, 130.5, 128.3, 115.4, 102.3, 62.29, 13.91. IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1208 (O-C-C), 1275 (C-C(=O)-O), 1365 (B-O), 1598 (C-C), 1723 (C=O), 3374 (OH, ν_s), 3460 (OH, ν_{as}).

Crystallographic data for NO-13: C₁₂H₁₂NO₄B, M = 245.04, colorless block, size 0.28 × 0.08 × 0.06 mm³, T = 293(2) K, Monoclinic, space group P2₁/n, a = 4.055(5) Å, b = 15.168(2) Å, c = 19.581(2) Å, β = 90.155 (5)°, V = 1204.4 (3) Å³, Z = 4, D_c = 1.351 g/cm³, μ = 0.100 mm⁻¹, F(000) = 512, 7527 reflections measured, 2120 independent, with R_{int} = 0.037; 170 parameters; Final agreement factors: R₁ = 0.1013 [F² > 2 σ (F²)], wR₂ = 0.2716 and GOOF = 1.181. The structure of NO-13 was refined as a pseudo merohedral twin (BASF = 0.110). Deposition Number CCDC: 1527388

(E)-3-(3-boronophenyl)-2-cyanoacrylic acid (NO-15): Produced in 4.5 h as a white solid in 20% yield (m.p. > 300 °C). δ H (300 MHz; DMSO- d_6 ; J in Hz) 8.34 (1H, s), 8.30 (1H, s), 8.09–8.07 (1H, d, J = 7.6 Hz), 8.01–7.98 (1H, d, J = 7.5 Hz), 7.58–7.53 (1H, t, J = 7.5 Hz). IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ 1364 (B-O), 1504 (C-C), 1691 (C=O), 2230 (C \equiv N), 3410 (OH).

Biological assays

Trypanosomatid cultures: *T. cruzi* epimastigote Y strains were cultivated in LIT medium (Tryptose liver infusion) supplemented with 10% fetal calf serum. 106 parasites/mL were used and maintained at a temperature of 28 °C under strong agitation (100 rpm). These cells were treated with boronic acids, DMSO or Benzimidazole for 24 and 72 h and live parasites were counted using a Neubauer chamber. At least 3 independent experiments were performed for each drug and dose, and the 50% effective concentration (EC₅₀) was determined using Prisma GraphPad 5.0.

Epimastigote viability assay: Formazan formation method was used to measure cellular viability. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay was used as previously described.^[60] Briefly, epimastigotes (1 × 10⁷ cells/mL) were incubated in RPMI 1640 culture medium at 37 °C for 24 h. Boronic acids were added at a final concentration of 10 μ M and then incubated for 24 or 72 h. For this assay, we used concentrations range from 1 nM – 1 mM. Formation of formazan was monitored at 570 nm in a multi-well reader (Spectramax M5, Molecular Devices).

Cell cultures: We used 4-week-old Swiss Webster mice to collect macrophages from peritoneal cavities. Macrophages were centrifuged and counted using a Neubauer chamber, maintained in serum-free medium for macrophages (Gibco, USA). These cells were cultivated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂ for 24 h until the experimentation. Our protocols adhered to the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and were approved by the Fiocruz Research Ethics Committee (number L-039/2016).

J774.G8 cell line, a murine macrophage line is derived from the original J774.A1 cell line from the American Type Cell Collection (ATCC, Rockville, MD). GH3 cell line is derived from rat's pituitary tumor cell line and U937 is a human histiocytic lymphoma cell line. J774 and GH3 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, St. Louis, MO) and U937 cultivated in RPMI 1640, both medium contained 10% fetal bovine serum (FBS) (Cultilab - Campinas, Brazil). All cell types were maintained at 37° C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. On reaching 80-90% confluence, the cells were detached using a solution of 0.025% trypsin and 0.4% EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) for 1 min.

Resazurin (Alamar Blue) proliferation assay: Reduction of the dye resazurin to resorufin was used to measure proliferation of the cell in cultures. Cells were seeded at 1 x 10⁵ trypan blue excluding cells/mL in 96-well microtiter plates. After incubating for 24 h, the DMEM medium was removed and replaced with fresh medium containing 40 μM resazurin, followed by an incubation period of 24 h, after which reduction of resazurin to resorufin was determined by fluorescence (excitation 530 nm; emission 590 nm) using a M5 microplate fluorometer (Molecular Devices, Florida, U.S.A.). Appropriate cell free controls were included in the test to account for potential interactions between the derivatives and resazurin.

Chemogenomics: The molecules were submitted to a chemogenomics approach using protocols of PIDGIN software^[61] for structural similarity analysis of molecules with biological activity described in the literature and ChEMBL database (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>). Standardizer was used for structure normalization of specific chemotypes, such as charges and tautomers (ChemAxon Standardizer v.16.5.2.0, 2016, <http://www.chemaxon.com>).

Molecular Docking: First, molecules were energy-optimized using Gaussian 03W, v.6.0 and Hartree-Fock with 6-31G(d) basis set. GOLD software v. 4.1.2 was used in docking studies.^[62] Ten GA runs were performed and "allow early termination" option has been disabled. Visual inspection of intermolecular interactions was performed with Pymol, v.1.8 and Discovery Studio, v.16.1.0.15350. Also, before docking, determined some appropriate parameters were determined by analysis of poses obtained by redocking of three different ligands co-crystallized with DYRK1A (PDB codes 2WO6, 2VX3 and 4NCT);^[63] using Goldscore and ChemPLP scoring functions and different binding site radii around the oxygen atom of GLU329, the reference atom in the study.

Acknowledgements

We acknowledge CNPq/Universal (455739/2014-5), PIBIC-UFF (for the student scholarship) and FAPERJ (Support for Studies of Neglected and Reemerging Diseases – E-26/010.001535/2014). We thank Elias Barreto for their suggestions regarding the writing process.

Keywords: boronic acids • tyrphostins • anticancer • trypanocidal • tyrosine kinases

References:

- [1] D. G. Hall in *Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives: Overview of Their Reaction and Applications*, 1st ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.
- [2] E. Frankland, B. F. Duppa, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1859**, *115*, 319-322; b) E. Frankland, B. F. Duppa, *Proc. Royal Soc. Lond.* **1859**, *10*, 568-570.
- [3] N. Miyaoura, A. Suzuki, *Chem. Commun.* **1979**, *19*, 866-867.
- [4] For reviews, see: a) A. Suzuki, *J. Organomet. Chem.* **1999**, *576*, 147-168; b) S. Kotha, K. Lahiri, D. Kashinath, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 9633-9695; c) A. J. J. Lennox, G. C. Lloyd-Jones, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 412-443. For applications, see: d) K. C. Nicolaou, P. G. Bulger, D. Sarlah, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 442-4484; e) H. Doucet, J. C. Hierso, *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2007**, *10*, 672-690; f) A. R. Louvis, N. A. A. Silva, F. S. Semaan, F. C. Silva, G. Saramago, L. C. S. V. De Souza, B. L. A. Ferreira, H. C. Castro, J. P. Sales, A. L. A. Souza, R. X. Faria, V. F. Ferreira, D. L. Martins, *New J. Chem.* **2016**, *40*, 7643-7656; g) D. L. Martins, H. M. Alvarez, L. C. S. Aguiar, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6814-6817.
- [5] a) G. F. Whyte, R. Vilar, R. Woscholski, *J. Chem. Biol.* **2013**, *6*, 161-174; b) S. D. Bull, M. G. Davidson, J. M. Van der Elsen, J. S. Fossey, A. T. Jenkins, Y. B. Jiang, Y. Kubo, F. Marken, K. Sakurai, J. Zhao, T. D. James, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 312-326; c) D. Li, Y. Chen, Z. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8097-8123.
- [6] M. J. Smith, M. J. Lawler, N. Kopp, D. D. Mcleod, A. H. Davulcu, D. Lin, K. Katipally, C. Sfougataki, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 1859-1863; b) M. M. Hansen, N. J. Kallman, T. M. Koenig, R. J. Linder, R. N. Richey, J. R. Rizzo, J. A. Ward, H. Yu, T. Y. Zhang, D. Mitchell, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 208-217; c) A. F. Biajoli, C. S. Schwalm, J. Limberger, T. S. Claudino, A. L. Monteiro, *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *25*, 2186-2214.
- [7] a) R. C. Kane, P. F. Bross, A. T. Farrel, R. Pazdur, *Oncologist* **2003**, *8*, 508-513; b) R. C. Kane, R. Dagher, A. Farrell, C. W. Ko, R. Sridhara, R. Justice, R. Pazdur, *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5291-5294; c) T. C. Kouroukis, F. G. Baldassarre, M. C. Cheung, *Curr. Oncol.* **2014**, *21*, e573-e603.
- [8] a) http://www.pmlive.com/top_pharma_list/pharmaceutical_products/velcade?start_rank=36. Accessed: march 2018; b) GlobalData: <https://www.globaldata.com/store/report/gdhc114pidr--pharmapoint-multiple-myeloma-global-drug-forecast-and-market-analysis-to-2023/https://www.globaldata.com/store/report/gdhc114pidr--pharmapoint-multiple-myeloma-global-drug-forecast-and-market-analysis-to-2023/>. Accessed: march 2018.
- [9] a) S. J. Baker, C. Z. Ding, T. Akama, Y. -K. Zhang, V. Hernandez, Y. Xia, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 1275-1288; b) P. C. Trippier, C. McGuigan, *Med. Chem. Commun.* **2010**, *1*, 183-198; c) H. S. Ban, H. Nakamura, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 616-635; d) A. E. Patterson, A. J. Flewelling, T. N. Clark, S. J. Geier, C. M. Vogels, J. D. Masuda, C. A. Gray, S. A. Westcott, *Can. J. Chem.* **2015**, *93*, 1305-1311.
- [10] W. Yang, X. Gao, B. Wang, *Med. Res. Rev.* **2003**, *23*, 346-368.
- [11] a) K. Shimizu, M. Maruyama, Y. Yasui, H. Minegishi, H. S. Ban, H. Nakamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1453-1456; b) A. M. LeBeau, P. Singh, J. T. Isaacs, S. R. Denmeade, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 665-674; c) T. M. Bradke, C. Hall, S. W. Carper, G. E. Plopper, *Cell Adh. Migr.* **2008**, *2*, 153-160.
- [12] H. Nakamura, H. Kuroda, H. Saito, R. Suzuki, T. Yamori, K. Maruyama, T. Haga, *ChemMedChem* **2006**, *1*, 729-740.
- [13] a) S. K. Kumar, E. Hager, C. Petit, H. Gurulingappa, N. E. Davidson, S. R. Khan, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2813-2815; b) A. Modzelewska, C. Pettit, G. Achanta, N. E. Davidson, P. Huang, S. R. Khan, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 3491-3495.
- [14] V. Ahmed, Y. Liu, C. Silventro, S. D. Taylor, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8586-8573.
- [15] H. S. Ban, T. Usui, W. Nabeyama, H. Morita, K. Fukusawa, H. Nakamura, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4415-4427.
- [16] T. Asano, H. Nakamura, Y. Uehara, Y. Yamamoto, *ChemBioChem.* **2004**, *5*, 483-490.
- [17] a) P. Yaish, A. Gazit, C. Gilon, A. Levitzki, *Science*, **1988**, *242*, 933-935; A. Levitzki, *Pharmacol. Ther.* **1999**, *82*, 231-239; b) M. L. Levitt, P. P. Koty, *Invest. New Drugs* **1999**, *17*, 213-226; c) A. Levitzki, E. Mishani, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 93-109.
- [18] a) C. M. Avila, N. C. Romeiro, *Rev. Virtual Quim.* **2010**, *2*, 59-82; b) G. B. L. de Freitas, L. V. B. Hoelz, D. L. M. Aguiar, R. B. de Alencastro, R. A. S. San Gil, *Rev. Virtual Quim.* **2009**, *1*, 257-269.
- [19] H. J. Wiggers, J. R. Rocha, W. B. Fernandes, R. Sesti-Costa, Z. A. Carneiro, J. Cheleski, A. B. F. da Silva, L. Juliano, M. H. S. Cezari, J. S. Silva, J. H. Mckerrow, C. A. Montanari, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2370.
- [20] M. Vieira, J. M. F. Dutra, T. M. U. Carvalho, N. L. Cunha-e-Silva, T. Souto-Padrón, W. Souza, *Histochem. Cell Biol.* **2002**, *118*, 491-500.

- [21] E. Knoevenagel, *Ber.*, **1894**, *27*, 2345-2346.
- [22] L. Kürti, B. Czako, *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis*, Elsevier Academic Press, San Diego, **2005**, pp. 242-243.
- [23] a) E. V. Dalessandro, H. P. Collin, L. G. L. Guimarães, M. S. Valle, J. R. Pliegg, *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 5300-5307; b) T. Lou, E. -T. Liao, A. Wilsily, E. Fillion, *Org. Synth.* **2012**, *89*, 115-125; c) S. F. Fioravanti, L. Pellacani, P. A. Tardella, M. C. Vergari, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1449-1451; d) N. Mase, T. Horibe, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1854-1857.
- [24] a) R. Trotzki, M. M. Hoffman, B. Ondruschka, *Green Chem.* **2008**, *10*, 767-772; b) S. Haferkamp, F. Fischer, W. Kraus, F. Emmerling, *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 2010-2014; c) C. R. M. O. Matos, F. S. Miranda, J. W. M. Carneiro, C. B. Pinheiro, C. M. Ronconi, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, *15*, 13013-13023.
- [25] a) D. C. Rideout, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 7816-7817; b) R. Breslow, *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 159-164.
- [26] F. Bigi, C. Quarantelli, *Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 31-39.
- [27] F. Bigi, M. L. Conforti, R. Maggi, A. Piccinno, G. Sartori, *Green Chem.* **2000**, *2*, 101-103.
- [28] P. A. Cox, A. G. Leach, A. D. Campbell, G. C. Lloyed-Jones, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 9145-9157.
- [29] R. N. Butler, A. G. Coyne, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6302-6337.
- [30] S. Fioravanti, L. Pellacani, P. A. Tardella, A. Morreale, G. Del Signore, *J. Comb. Chem.* **2016**, *8*, 808-811.
- [31] G. Shikanth, U. K. Ray, D. V. N. S. Rao, P. B. Gupta, L. Lavanya, A. Islam, *Synth. Commun.* **2012**, *42*, 1359-1366.
- [32] D. Rognan, *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *152*, 38-52.
- [33] L. Wang, X. Q. Xie, *Future Med. Chem.* **2014**, *6*, 247-249.
- [34] A. Walte, K. Rübén, R. Birner-Gruenberger, C. Preisinger, S. Bamberg-Lemper, N. Hilz, F. Bracher, W. Becker, *FEBS J.* **2013**, *280*, 4495-4551.
- [35] a) X. Guo, J. G. Williams, T. T. Schug, X. Li, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 13223-13232; b) 34 P. Fernández-Martínez, C. Zahonero, P. Sánchez-Gómez, *Mol. Cell. Oncol.* **2015**, *30*, 2(1):e970048; c) A. Radhakrishnan, V. Nanjappa, R. Raja, G. Sathe, V. N. Puttamalles, A. P. Jain, S. M., S. A. Balahi, S. Chavan, N. A. Sahasrabudhe, P. P. Mathur, M. M. Kumar, T. S. Prasad, V. Santosh, G. Sukumar, J. A. Califano, A. Rangarajan, D. Sidransky, A. Pandey, H. Gowda, A. Chatterjee, *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36132.
- [36] N. Pozo, C. Zahonero, P. Fernández, J. M. Liñares, A. Ayuso, M. Hagiwara, A. Pérez, J. R. Ricoy, A. Hernández-Lain, J. M. Sepúlveda, P. Sánchez-Gómez, *J. Clin. Invest.* **2013**, *123*, 2475-2487.
- [37] C. A. Pickett, A. Gutierrez-Hartmann, *Biochemistry* **1994**, *91*, 8612-8616.
- [38] a) L. J. Eales-Reynolds, H. Laver, H. Modjtahedi, *Cytokine* **2001**, *7*, 169-172; b) S. Zhang, V. Chitu, E. R. Stanley, B. E. Elliott, P. A. Greer, *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1465-1473; c) Y. Takada, B. B. Aggarwal, *J. Immunol.* **2004**, *173*, 1066-1077.
- [39] E. M. McAuley, T. A. Bradke, G. E. Plopper, *Cell Adh. Migr.* **2011**, *5*, 382-386.
- [40] G. Vlotides, E. Siegel, I. Donangelo, S. Gutman, S. -G. Ren, S. Melmed, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 6377-6386.
- [41] J. Savikko, J. M. Rintala, S. Rintala, P. Koskinen, *Transpl. Immunol.* **2015**, *32*, 175-178.
- [42] N. Lu, L. Wang, H. Cao, L. Liu, L. Van Kaer, K. T. Wilson, X. Ren, X. Hao, D. B. Polk, F. Yan, *J. Immunol.* **2014**, *192*, 1013-1023.
- [43] F. H. Guedes-da-Silva, D. G. Batista, M. B.; Meuser, K. C. Demarque, T. O. Fulko, J. S. Araújo, P. B. da Silva, D. A. Patrick, S. M. Bakunova, S. A. Bakunova, R. R. Tidwell, G. M. Oliveira, C. Brito, O. C. Moreira, M. N. Soeiro, *Agents Chemother.* **2016**, *25*, 2425-2434.
- [44] L. A. Cortes, L. Castro, B. Pesce, J. D. Maya, J. Ferreira, V. Castro-Castillo, E. Parra, J. A. Jarra, R. López-Muñoz, *PLoS One* **2015**, *10*(8): e0136852.
- [45] D. Steverding, X. Wang, *Parasit. Vectors* **2009**, *2*, 29.
- [46] S. Brand, L. A. T. Cheghorn, S. P. McElroy, D. A. Robinson, V. C. Smith, I. Hallyburton, J. R. Harrison, N. R. Norcross, D. Spinks, T. Bayliss, S. Norval, L. Stojanovski, L. S. Torrie, J. A. Frearson, R. Brenk, A. H. Fairlamb, M. A. J. Ferguson, K. D. Read, P. G. Wyatt, I. H. Gilbert, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 140-152.
- [47] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, D. C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A. Tran, E. Ghedin, E. A. Worthey, A. L. Delcher, G. Blandin, S. J. Westenberger, E. Caler, G. C. Cerqueira, C. Branche, B. Haas, A. Anupama, E. Arner, L. A. Slund, P. Attipoe, E. Bontempi, F. Bringaud, P. Burton, E. Cadag, D. A. Campbell, M. Carrington, J. Crabtree, H. Darban, J. F. da Silveira, P. de Jong, K. Edwards, P. T. Englund, G. Fazelina, T. Feldblyum, M. Ferella, A. C. Frasch, K. Gull, D. Horn, L. Hou, Y. Huang, E. Kindlund, M. Klingbeil, S. Kluge, H. Koo, D. Lacerda, M. J. Levin, H. Lorenzi, T. Louie, C. R. Machado, R. McCulloch, A. McKenna, Y. Mizuno, J. C. Mottram, S. Nelson, S. Ochaya, K. Osoegawa, G. Pai, M. Parsons, M. Pentony, U. Pettersson, M. Pop, J. L. Ramirez, J. Rinta, L. Robertson, S. L. Salzberg, D. O. Sanchez, A. Seyler, R. Sharma, J. Shetty, A. J. Simpson, E. Sisk, M. T. Tammi, R. Tarleton, S. Teixeira, S. Van Aken, C. Vogt, P. N. Ward, B. Wickstead, J. Wortman, O. White, C. M. Fraser, K. D. Stuart, B. Andersson, *Science* **2005**, *309*, 409-415.
- [48] 24 a) J. H. McKerrow, P. J. Rosenthal, R. Swenerton, P. Doyle, *Curr. Opin. Infect. Disc.* **2008**, *21*, 668-672. b) A. B. Vermelho, A. C. N. de Melo, R. A. Soares, D. S. Alviano, E. P. Souza, T. Souto-Padrón, G. C. Rodrigues, A. P. de Aguiar, M. C. Pereira, A. Ferreira-Pereira, M. S. S. Rosa, M. N. L. Meirelles, C. S. Alviano, *Open Parasitol. J.* **2010**, *4*, 5-23.
- [49] a) R. Smoum, A. Rubinstein, V. M. Dembitsky, M. Srebnik, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 4156-4220. b) T. P. Smith, I. W. Windsor, K. T. Torest, R. T. Raines, *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 7820-7834. c) S. R. Inglis, A. Zervosen, E. C. Y. Woon, T. Gerards, N. Teller, D. S. Fischer, A. Luxen, C. J. Schofield, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 6097-6106.
- [50] J. H. McKerrow, P. S. Doyle, J. C. Engel, L. M. Podust, S. A. Robertson, R. Ferreira, T. Saxton, M. Arkin, I. D. Kerr, L. S. Brinen, C. S. Craik, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2009**, *104*, 263-269.
- [51] M. M. M. Santos, R. Moreira, *Min. Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 1040-1050.
- [52] L. A. A. Avelar, C. D. Camilo, S. Albuquerque, W. B. Fernandes, C. Gonçalves, P. W. Kenny, A. Leitão, J. H. McKerrow, C. A. Montanari, E. V. M. Orozco, J. F. R. Ribeiro, J. R. Rocha, F. Rosini, M. E. Saidel, *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003916.
- [53] V. Martechonok, J. B. Jones, *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 679-684.
- [54] APEX3: Bruker (2015). APEX3 and SAINT. Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [55] SADABS: L. Krause, R. Herbst-Irmer, G. M. Sheldrick, D. Stalke, *J. Appl. Cryst.* **2015**, *48*, 3-10.
- [56] SHELXS and SHELXL: G. M. Sheldrick, *Acta Cryst.* **2015**, *C71*, 3-8.
- [57] a) G. Li, J. Xiao, W. Zhang, *Green Chem.* **2011**, *13*, 1828-1836; b) J. B. M. R. Filho, G. P. Pires, J. M. G. O. Ferreira, E. E. S. Teotônio, J. A. Vale, *Catal. Lett.* **2017**, *147*, 167-180.
- [58] a) Z. Ren, W. Cao, W. Tong, *Synthetic Commun.* **2002**, *32*, 3475-3479; b) J. A. Cabello, J. M. Campelo, A. Garcia, D. Luna, J. M. Marinas, *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 5195-5197.
- [59] M. L. Deb, P. J. Bhuyan, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6453-6456.
- [60] M. Faundez, P. Pino, P. Letelier, C. Ortiz, R. López, C. Seguel, J. Ferreira, M. Pavani and A. Morello. J. D. Maya, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 126-130.
- [61] L. H. Mervin, A. M. Afzal, G. Drakakis, R. Lewis, O. Engkvist, A. Bender, *J. Cheminform.* **2015**, *7*, 51.
- [62] G. Jones, P. Willett, R. C. Glen, A. R. Leach, R. Taylor, *J. Mol. Biol.* **1997**, *267*, 727-748.
- [63] a) M. Soundararajan A. K. Roos, P. Savitsky P. Filippakopoulos, A. N. Kettenbach, J. V. Olsen, S. A. Gerber, J. Eswaran, S. Knapp, J. M. Elkins, *Structure* **2013**, *21*, 986-996; b) M. Alexeeva, E. Åberg R. A. Engh, U. Rothweiler, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **2015**, *71*, 1207-1215.

APÊNDICE C

Journal of Bioenergetics and Biomembranes

<https://doi.org/10.1007/s10863-019-09802-x>

Arylboronic acids inhibit P2X7 receptor function and the acute inflammatory response



Robson Xavier Faria^{1,2}  & Noemi de Jesus Hiller³ & Juliana Pimenta Salles¹ & Jackson Antonio Lamounier Camargos Resende⁴ & Roberta Tosta Diogo^{1,2} & Natalia Lidmar von Ranke^{2,5} & Murilo Lamim Bello⁵ & Carlos Rangel Rodrigues⁵ & Helena Carla Castro² & Daniela de Luna Martins³

Received: 14 January 2019 /Accepted: 26 May 2019
Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

The P2X7 receptor (P2X7R) is an ion channel which is activated by interactions with the extracellular ATP molecules. The molecular complex P2X7R/ATP induces conformational changes in the protein subunits, opening a pore in the ion channel macromolecular structure. Currently, the P2X7R has been studied as a potential therapeutic target of anti-inflammatory drugs. Based on this, a series of eight boronic acids (NO) analogs were evaluated on the biologic effect of this pharmacophoric group on the human and murine P2X7R. The boronic acids derivatives NO-01 and NO-12 inhibited in vitro human and murine P2X7R function. These analogs compounds showed effect better than compound BBG and similar to inhibitor A740003 for inhibiting dye uptake, in vitro IL-1 β release and ATP-induced paw edema in vivo. In both, in vitro and in vivo assays the compound NO-01 showed to be the hit compound in the present series of the arylboronic acids analogs. The molecular docking suggests that the NO derivatives bind into the upper body domain of the P2X7 pore and that the main intermolecular interaction with the two most active NO derivatives occur with the residues Phe 95, 103 and 293 by hydrophobic interactions and with Leu97, Gln98 and Ser101 by hydrogen bonds.. These results indicate that the boronic acid derivative NO-01 shows the lead compound characteristics to be used as a scaffold structure to the development of new P2X7R inhibitors with anti-inflammatory action.

Keywords P2X7R . Boronic acids . Dye uptake . IL-1 β release . Paw edema . Molecular docking

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10863-019-09802-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Robson Xavier Faria salvador@ioc.fiocruz.br
Noemi de Jesus Hiller noemihiller@id.uff.br
Juliana Pimenta Salles julianasalles@id.uff.br
Jackson Antonio Lamounier Camargos Resende jresende@id.uff.br
Roberta Tosta Diogo robertadiogo@id.uff.br
Natalia Lidmar von Ranke natalialidmar@id.uff.br
Murilo Lamim Bello murilolamim@pharma.ufrj.br
Carlos Rangel Rodrigues rangel@pharma.ufrj.br
Helena Carla Castro hcrangel@ib.uff.br
Daniela de Luna Martins dlmartins@id.uff.br

¹ Laboratory of Toxoplasmosis and Other Protozoans, Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4365, Pavilion 108, room 32, CEP, Rio de Janeiro, Fiocruz 21045-900, Brazil.

² Postgraduate Program in Sciences and Biotechnology, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil

³ Research Group on Catalysis and Synthesis, Laboratory 413, Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brazil.

⁴ Laboratory of Solid State Chemistry, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Mato Grosso, Barra do Garças, MT, Brazil.

⁵ Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Introduction

P2X family takes part in the purinergic signaling network where ATP (adenosine 5'-triphosphate), other nucleotides and nucleosides are the extracellular signaling molecules (Bartlett et al. 2014). Together with P2Y family, P2X receptors are involved in the cellular response to extracellular ATP molecules (Baas 2012). P2X receptors are trimeric ligand-gated cation channels whose family consists of seven members of receptors (P2X1–7). Comparatively, the monomeric unit of the P2X7 receptor (P2X7R) is the highest among members of the P2X family. This subtype also differs from the others because it has a large number of amino acids residues in the intracellular C terminus (Baas 2012; Burnstock and Knight 2018). P2X7R is present in many cell types including hematopoietic lineages, epithelial and endothelial cells, fibroblasts, osteoblasts, astrocytes, Schwann cells, some populations of neurons, and cells from microglia, among others (Bartlett et al. 2014).

Differently from the other members of the P2X family, P2X7R when activated for micromolar ATP concentrations leads to the opening of the channels for the flux of small cations (Na^+ , K^+ or Ca^{2+}) through the plasma membrane. When P2X7R is stimulated for high ATP concentrations (mM range) and, after prolonged or repeated stimulation, thus a larger permeability state is reached forming or inducing a large conductance ionic channel (Faria et al. 2017; North 2002). Molecules with a mass of up 900 Da can permeate the membrane by these large pores, which makes possible the liberation of inflammatory cytokines (Young and Górecki 2018). Activation of P2X7R gives rise to a sequence of signaling events, which are reliant on the cell type expressing this receptor, the ATP extracellular concentration and other conditions of the extracellular medium (Bartlett et al. 2014).

According to the cell type, P2X7R activation modulates different signaling pathways leading to the activation of the caspase-1-containing inflammasome NLRP3, release of proinflammatory molecules; such as interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18) and interleukin-36 α (IL-36 α); activation of metalloproteases and other proteases, the formation of reactive oxygen species (ROS) and other events. There are many evidences which support that the P2X7R is an essential target to be investigated for the treatment of a variety of diseases (Bartlett et al. 2014; Chen et al. 2018; Gorodeski 2012; Savio et al. 2018; Skaper 2011; Sugiyama 2014; Tsuda et al. 2010). Several diseases states are associated with P2X7R single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Volonté et al. 2012) and other related to the role that P2X7R exerts in disorders such as the inflammatory and immune response, for instance (Baudelet et al. 2015; Rech et al. 2016). Therefore, the development of P2X7R inhibitors may be a relevant strategy for the discovery of new drugs for the treatment of inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis (Mehta et al. 2014).

A conserved tyrosine residue (tyrosine-343) in the carboxyl terminus of the P2X7R, when phosphorylated can affect the function of this receptor (Kim et al. 2001). Taking this information into account, Wiley and co-workers evaluated the influence of 18 protein tyrosine kinase inhibitors on the $^{86}\text{Rb}^+$ efflux mediated by the human P2X7R. A phthalazinamine derivative (compound P), which inhibits the vascular endothelial growth factor receptor kinase, was found to be the most potent compound, blocking the ATP-induced cation efflux by 76% in human B-lymphocytes and by 66% in erythrocytes in a dose-dependent manner (half-maximum inhibitory concentration - $\text{IC}_{50} \cong 5 \mu\text{M}$) in both cells. The authors suggested that compounds targeting the ATP-binding sites of kinases would be potential blockers of the P2X7R (Shemon et al. 2006).

An important class of inhibitors of tyrosine kinases is the tyrphostin group which is benzylidene malonitriles molecules that can inhibit the cell-signaling transduction by decreasing tyrosine phosphorylation. Tyrphostins are tyrosine kinase (TYK) inhibitors enzymes that play critical roles in the inflammation process. Therefore, tyrphostins molecules are bioactive compounds which have been shown a promising anti-inflammatory activity (Fig. 1) (Dimitrova and Ivanovska 2013; Gyurkovska et al. 2014).

Recently, the effect of introducing the boronic acid group $\text{B}(\text{OH})_2$ in arylcyanovinyl compounds, that can be classified as tyrphostins compounds was investigated in their anticancer properties by our research group. A series of boronic acid derivatives were synthesized, generating the compounds of NO series (Fig. 2). From this boronic acid analogs series, the compound NO-12 displayed high antiproliferative activity against GH3 cell lines from rat pituitary tumor ($0.14 \pm 0.09 \mu\text{M}$), whereas compound NO-13 has shown antiproliferative potential against the human leukemic monocyte lymphoma cell line U937 ($9.83 \pm 1.07 \mu\text{M}$) (Hiller et al. 2018).

In addition to compounds in the NO series, there are other studies showing the introduction of the B(OH)₂ unit into the aromatic ring of known anticancer compounds resulting in better activities or bioavailability or modifying the performance profile of these compounds (Ahmed et al. 2006; Asano et al. 2004; Ban et al. 2009; Bradke et al. 2008; Kumar et al. 2003; LeBeau et al. 2008; Modzelewska et al. 2006; Nakamura et al. 2006; Shimizu et al. 2010). Bortezomib, for example, is proteasome inhibitor current in use in multiple myeloma therapy (Buac et al. 2013; Diaz and Yudin 2017; Dou and Zonder 2014). Due to their empty p orbital, boronic acids can coordinate to the heteroatoms present in enzymes and receptors in a reversible covalent mechanism. These characteristics are responsible for the recent growing interest both in the industry and in the academy for the development of new boron-based drugs (Baker et al. 2009; Ban and Nakamura 2015; Das et al. 2013, 2013).

Since arylboronic acids derivatives can show different pharmacological activities, in the present work, the action of NO series compounds was evaluated on the P2X7R. This study was based on the

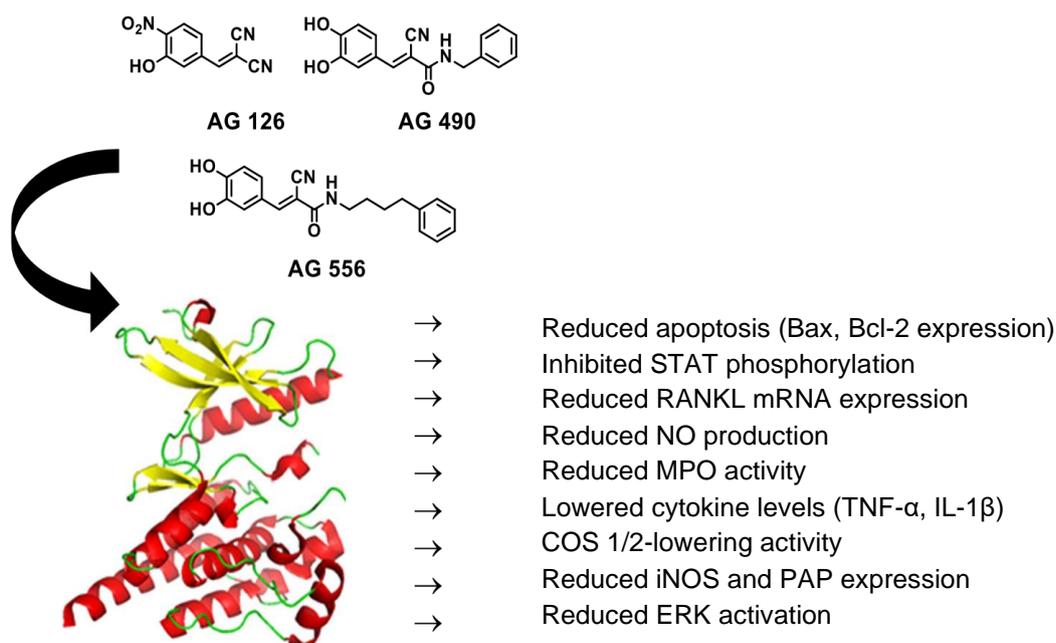


Fig. 1 Anti-inflammatory tyrophostins examples and potential activities for this class of TYKs inhibitors

following observations from the literature reports and our group's results: 1) tyrosine kinase inhibitors may be potential blockers of the P2X7R; 2) tyrophostins are tyrosine kinase inhibitors whose antiinflammatory activity has already been demonstrated; 3) the introduction of the B(OH)₂ moiety into known anticancer agents, including tyrosine kinase inhibitors, led to compounds with improved activity in many cases; 4) tyrophostins containing the B(OH)₂ moiety can interact with residues by both hydrogen and covalent bonds; 5). To the best of our knowledge, tyrophostins containing B(OH)₂ moiety have not yet been evaluated as blockers of the P2X7R (Groziak 2001; Koehler and Lienhard 1971; Matthews et al. 1975; Philipp and Bender 1971; Suenaga et al. 1996; Weston et al. 1998; Zervosen et al. 2012).

Materials and methods

Chemistry

Materials and apparatus were used for the NO series synthesis. Common and deuterated solvents, ethyl cyanoacetate, malononitrile, and cyanoacetic acid were purchased from Sigma Aldrich Brazil LTDA. Boronic acids were purchased from Combi-Blocks. All these substances were employed as received, without being previously submitted to purification processes. Products (NO series) were purified by recrystallization using a suitable solvent. The reported yields are an average of triplicates and refer to the isolated ones after recrystallization. The melting points (mp) of the pure products were recorded on a Fisatom 413D apparatus. Reaction progress was monitored through analytical thin-layer chromatography (Silicycle Ultrapure Silica Gels, F254) and the spots were visualized by UV light or by reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine. Nuclear magnetic

resonance (NMR) spectra were recorded on a Varian VNMRs (300 or 500 MHz) instrument in CDCl₃ or DMSO-d₆. Chemical shift data were represented in units of δ (ppm) downfield from the internal standard: tetramethylsilane (TMS). Coupling constants (J) are reported in Hertz and refer to apparent peak multiplicities. Infrared (IR) spectra were measured on KBr pellets with a Varian FT-IR 660 Spectrophotometer.

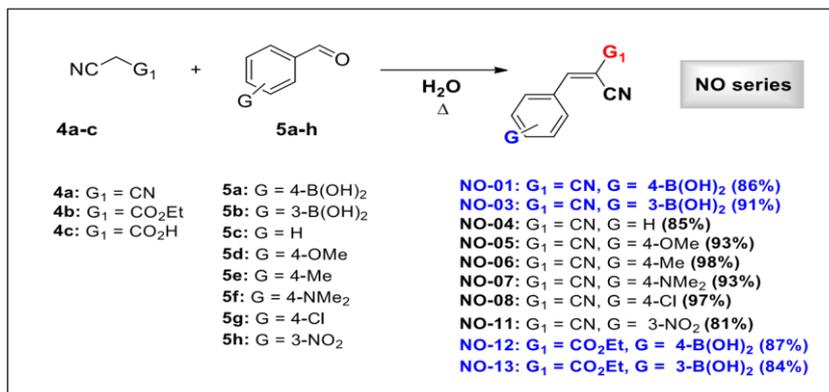


Fig. 2 NO series synthesized by Knoevenagel condensation of the aromatic aldehydes (Hiller et al. 2018)

Knoevenagel condensations

Following the procedure previously reported by our group (Hiller et al. 2018), it was prepared different tyrophostins by Knoevenagel condensations (Bhattacharya et al. 2014; Cabello et al. 1984; de Resende Filho et al. 2017; Deb and Bhuyan 2005; Li et al. 2011; Mukhopadhyay and Datta 2008; Ren and Cai 2007; Wang et al. 2001). The active methylene containing compound (2 mmol) (malononitrile, ethyl cyanoacetate or cyanoacetic acid), aldehyde (2 mmol) and distilled water (10 mL) were added to a rounded-bottom flask to which a reflux condenser was coupled. With the aid of an oil bath, the reaction mixture was kept at 80 °C while being magnetically stirred for 2.5–4.5 h. The progress of the reaction was monitored by Thin Layer Chromatography (TLC) using 2,4-dinitrophenylhydrazine to monitor the aldehyde consumption. After the reaction was completed, the reaction mixture was allowed to reach ambient temperature, and the product was obtained after vacuum filtration and washing with cold water. Products were dried under air. Pure samples were obtained after recrystallization with the suitable solvents. Data from the IR and NMR analyzes were compared with data from the literature, when available, as well as data obtained in our previous work (Hiller et al. 2018).

Biological assays

In vitro experiments

Mice peritoneal macrophages Male Swiss Webster mice suffered peritoneal cavity lavage for harvesting peritoneal macrophages. This protocol adhered to the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the FIOCRUZ Research Ethics Committee (number LW-033/12). The experimental protocol used was similar to Faria and collaborates in 2018 (Faria et al. 2018).

HEK 293 cells expressing human P2X7R HEK293 cells expressing human P2X7R was maintained in according to describe for Faria and collaborates (Faria et al. 2018).

Dye uptake assay P2X7R inhibitors and NO series compounds were pre-incubated for 10 min. P2X7R inhibitors doses ranged from 1 ng/mL to 500 μ g/mL and, NO series compounds doses fluctuated from 0.01 ng/mL to 10 μ g/mL. Then, mouse peritoneal macrophages (5.0×10^5 cells) were treated with 5 mM ATP for 25 min at 37 °C and propidium iodide (PI) (0.05 mg/mL in phosphate-buffered saline - PBS) or ethidium bromide (EB) incubation (25 μ M in PBS), in the last 5 min of ATP treatment. HEK293 cells expressing human P2X7R (2.5×10^6 cells/mL) followed the same protocol above. These cells incubated for 24 h suffer antagonists and ATP treatment, as described for peritoneal macrophages, with posterior in the last 5 min. EB fluorescence measured with a Gemini fluorescence plate reader at an excitation wavelength of 530 nm and, an emission wavelength of

620 nm. PI fluorescence measured with a FACS Calibur Flow cytometer at an excitation wavelength of 488 nm and, an emission wavelength of 60 nm.

IL-1 β enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) THP-1 (human monocytic cell line derived from an acute monocytic leukemia patient) cells differentiation, activation and, maintaining were realized in according to Faria and collaborate in 2018 (Faria et al. 2018). Brilliant Blue G (BBG), A740003 (N-(1-(((Cyanoamino)(5-quinolinylamino)methylene)amino)-2,2-dimethylpropyl)-3,4-dimethoxybenzeneacetamide) and NO series compounds were added after 200 min of lipopolysaccharide (LPS) incubation, and 10 min before 5 mM ATP addition until complete 240 min of LPS incubation. The treated samples were collected, centrifuged at 1500 RPM for 5 min at 4 °C and, the supernatants were stored at -70 °C. Measuring IL-1 β release using the Human IL-1 beta ELISA Kit (ab46052 -ABCAM, Cambridge). Primed peritoneal macrophages activation and treatment was similar to THP-1 cells and the mature IL-1 β released quantified by sandwich ELISA following the manufacturer's protocol (eBioscience, San Diego, CA, USA).

Caco-2 cells culture and treatments Caco-2 cell cultured was similar to describe at Faria and collaborates in 2018 (Faria et al. 2018). Boronic acids derivatives NO-01 and NO-12, vinblastine and propranolol at 100 μ M were prepared in the transport buffer (HBSS and 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)) at pH 7.4 or 6.5 with 0.5% (v/v) DMSO. After Caco-2 cells incubation for 30 min, 0.3 mL of the transport buffer in the apical wells were removed and the drugs added for 60 min. LY concentrations contained in the donor and acceptor wells were measured on the plate reader M5 (molecular probes) at an excitation wavelength of 485 nm and the emission wavelength of 530 nm.

pH dependent-solubility of NO-01 and NO-12 NO-01 and NO-12 solubility was assessed from 1 to 250 μ M by using DMSO (5 μ L) into 995 μ L buffer (pH 2.0-hydrochloride, 4.0– 100 mM citrate buffer and 7.4–100 mM phosphate buffer). This solution was dispensed in a 96-well plate at room temperature for 2 h. Calibration standards were prepared by adding 5 μ L of DMSO into 995 μ L acetonitrile/buffer (1:1) mixture. After centrifugation (10,000 rpm, 10 min, 25 °C), the reaction samples were diluted 1:1 with acetonitrile.

Distribution coefficient (LogD) in octanol/PBS pH 7.4 A solution containing Octanol and PBS pH 7.4 at a ratio of 1:1 (v/v) was shaken mechanically for 24 h to reach the pre-saturation. Arylboronic acids analogs NO-01 and NO-12 (25 mM) in a volume of 4 μ L added to 396 μ L PBS for partitioning with octanol (100–400 μ L). The samples were shaken; centrifuged (3000 rpm for 5 min), and after 1 h of standing the PBS layer was collected. Acetonitrile (100 μ L) was added to a 100 μ L aliquot of the PBS layer, and the absorbance sample was measured. The compounds were evaluated for two standard to validate the assay.

In vitro stability assays in liver microsomes Male mice and humans liver microsomes (0.5 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.4), arylboronic acids analogs NO-01 and NO12 (1 μ M) and DMSO (0.5 μ M) were pre-incubated at 37 °C before NADPH addition (1 mM) to initiate the reaction in a final incubation volume of 50 μ L. A buffer containing 0.1 M phosphate at pH 7.4 was used as a negative control and diazepam and verapamil as a positive control for mice and humans, respectively. Drugs were incubated for 0, 5, 15, 30, and 45 min with the microsomes and the negative control (minus NADPH) for 45 min. Methanol (50 μ L) stopped the reactions at the appropriate time points and the samples centrifuged (1640xg for 20 min at 4 °C) to precipitate the proteins. Intrinsic clearance (CL_{int mic}) for NO-01 and NO-12 microsomes was calculated according to Biosystem instructions (Faria et al. 2018).

Electrophysiological measurements For whole-cell configuration assay was used a pipette with series resistance set as 5–11 M Ω for all the experiments in standard saline for bath and pipette solutions. Ionic currents were not compensated for recordings less than 1600 pA, however, they were compensated by 91% for values above to this value. Macrophage cell capacitance was 19.4 \pm 6.24 pF; n = 73 and the holding potential of -60 mV at 37 °C for all recordings.

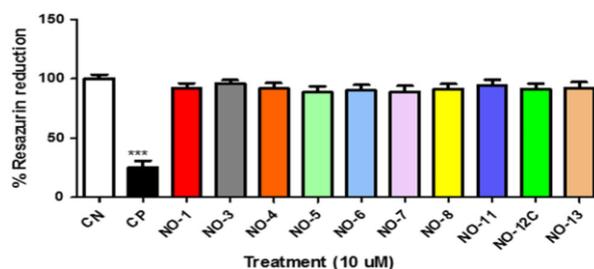


Fig. 3 Cytotoxicity in mammalian cells. (A) Mice peritoneal macrophages were treated with 100 μ M of the NO derivatives (NO-01, NO03, NO-04, NO-05, NO-07, NO-11, NO-12, and NO-13 for 72 h. The graphic results represent 3–5 independent, lactate dehydrogenase (LDH) release assays. These results are expressed as mean \pm s.d. ***significantly different from the negative control value at $P < 0.05$. CP – positive control (cells treated with 0.1% Triton X-100); CN – negative control (no treated cells)

Saline solutions for electrophysiology The bath solution (in mM) consisted of the following: 150 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂ and, 10 HEPES (pH, 7.4) and the pipette solution (in mM): 150 KCl, 5 NaCl, 1 MgCl₂, 10 HEPES and, 0.1 ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) pH, 7.4.

Drug application Perfusion chamber (RC-24 chamber, Warner Instrument Corp.) was used at a rate of 1 mL/min. All the drugs were dissolved immediately before use. Compounds NO and P2X7R inhibitors were added 1–5 min before 1–5 mM ATP stimulation for 5 min at 37 °C.

In vivo experiments

Paw edema Compounds NO were administered intraperitoneally at 60 min before intrathecal ATP (2.5 mM/paw) administration. Mouse paw edema was measured after 30 min of ATP treatment using a plethysmometer (Insight, Brazil). This protocol adhered to the Ethical Principles in Animal Experimentation adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and approved by the FIOCRUZ Research Ethics Committee (number LW-58/14).

Statistical analyses

The results are presented as means \pm standard deviations of the means (S.D.M.). D’Agostino and Pearson normality tests were used to test whether data followed a Gaussian distribution. In data following a Gaussian distribution, we applied an analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey’s test.

Table 1 Antagonistic effects of P2X7R inhibitors and NO series compounds against ATP-induced dye uptake in mice peritoneal macrophages

P2X7R inhibitors and NO series compounds	mP2X7 IC ₅₀ (μ M)
BBG	15.23 \pm 1.65
A740003	0.897 \pm 1.12
NO-01	0.639 \pm 0.11
NO-03	46.88 \pm 5.24
NO-04	11.84 \pm 2.08
NO-05	75.44 \pm 4.55
NO-06	102.3 \pm 3.02
NO-07	88.41 \pm 5.47
NO-08	6.61 \pm 0.41
NO-11	54.68 \pm 4.77
NO-12	0.939 \pm 0.21
NO-13	91.02 \pm 1.33

Values are means of 2–4 experiments. Compounds tested at the mice peritoneal macrophages

^aIC₅₀ = 50% inhibitory concentrations were obtained from concentration–response curves

Otherwise, we applied the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn’s test. PRISM® software (GraphPad, Inc., San Diego, CA, USA) was used for all statistical analyses.

In silico analysis **ADMET properties**

The ADMET properties analysis of NO-01 and NO-12 were performed using the admetSAR (Structure-activity relationship) program, which computes a pharmacokinetic and toxicological profile (Cheng et al. 2012).

Comparative modeling

The human P2X7R model was prepared using the approach described previously (Faria et al. 2018).

Ligands molecular modeling

Chemicalize® software (ChemAxon) (Swain 2012) was used to determine the non-ionized states of the NO compounds at physiological pH 7.4. The Spartan’10 v.1.0.1 program was used to build the molecular structures. The MMFF94 (Merck Molecular Force Field) was used to generate the conformer distribution of the compounds (Halgren 1996). Then the geometry optimization was applied with the semi-empirical RM1 (Recife Model 1) method (Rocha et al. 2006).

Molecular docking

The molecular docking was performed using the algorithm MolDock (Thomsen and Christensen 2006) with the Molegro Virtual Docker (MVD) 6.0 program (CLC Bio, 8200, Aarhus, Denmark). The MolDock score [GRID] algorithm was used as the score function with a grid resolution of 0.30 Å. The partial charges were assigned according to the MVD charges scheme. The search algorithm used was the MolDock Optimizer with a search space of 40 Å around the area where the cavities of the P2X7R were found. The ligand evaluation was considered concerning internal electrostatic interactions (ES), internal hydrogen bond (HBond) and Sp2Sp2 torsions. Every molecular docking was performed 50 runs with the same parameters set (population size = 50, max iterations = 2000, scaling factor = 0.50 and crossover rate = 0.90), followed by energy minimization. The poses binding modes were selected based on the best rank score.

Table 2 Cellular toxicity and Selectivity of P2X7R inhibitors and arylboronic acids analogs

P2X7R inhibitors and arylboronic acids analogs	mP2X7 CC ₅₀ (µM) (macrophages)	Selectivity index (aCC ₅₀ /IC ₅₀)
BBG	85.62 ± 2.77	5.62
A740003	351.1 ± 11.76	391.4
NO-01	443 ± 25.7	693.2
NO-12	329.6 ± 16.82	392.8

^a CC₅₀ = 50% inhibitory concentrations were obtained from concentration response curves

Results and discussion

Synthesis

Benzene vinyl nitriles were prepared by Knoevenagel condensations between aromatic aldehydes and malononitrile or ethyl cyanoacetate without catalysis and employing water as solvent. Products were obtained in high yields (> 80%) and high purity by simple vacuum filtration after reaction has reached the ambient temperature, as previously reported by our group. For the biological purposes, products were purified by recrystallization using water/ethanol or water/acetone as solvents. For the cases where two diastereoisomers (E or Z) can be formed by the Knoevenagel reactions (NO-12 and NO-13), evidence verified by NMR spectra analysis that only one stereoisomer was formed, for which E-configuration was attributed by comparison with the previously obtained datum, which had been confirmed by monocystal X-ray diffraction.

Biological assay

In vitro

Mouse peritoneal macrophages treated with NO series compounds continuously for 72 h (Fig. 3) in the concentration of 10 µM. These analogs did not cause LDH release in this concentration, when compared with

positive control for LDH release, the Triton X-100 detergent. This result indicates a low toxicity for these analogs in mammalian cells, therefore all analogs in sequence were tested in assays to evaluate the capacity of inhibiting the P2X7R function. This reduced toxicity in primary cell was consistent with previous publication. Mice peritoneal macrophages treated with the NO series compounds did not affect the cellular metabolism activity after 72 h of treatment (Hiller et al. 2018).

Table 3 Antagonistic effects of most active NO compounds against ATP-induced PI uptake in HEK 293 cells transfected with hP2X7R

P2X7R inhibitors and arylboronic acids	PI-uptake in HEK293 cells transfected with human P2X7R IC ₅₀ (μ M)	THP-1 cells IC ₅₀ (μ M) IL-1 β release	Mice Peritoneal macrophages IC ₅₀ (μ M) IL-1 β release
BBG	4.97 \pm 0.62	0.783 \pm 0.063	0.907 \pm 0.077
A740003	0.129 \pm 0.041	0.087 \pm 0.031	0.114 \pm 0.02
NO-01	0.031 \pm 0.002	0.021 \pm 0.011	0.042 \pm 0.013
NO-12	0.105 \pm 0.011	0.243 \pm 0.034	0.537 \pm 0.065

NO series compounds caused inhibitory action on mice P2X7R activity as observed for dye uptake assay (Table 1). In addition, NO series compounds activities were compared to BBG and A740003 (selective), both P2X7R inhibitors. Therefore, the compounds NO-03, NO-05, NO-06, NO-07, NO-11 and NO-13 exhibited IC₅₀ values superior to BBG and A740003. The compounds NO-04 and NO-08 showed IC₅₀ values between BBG and A740003. The compounds NO-01 and NO-12 demonstrated higher inhibitory efficiency to than other compounds NO, BBG and A740003 (Table 1). ATP-induced P2X7R dye uptake was inhibited for compounds NO-01 and NO-12 with IC₅₀ = 0.639 μ M and 0.839 μ M, respectively. The IC₅₀ values for these compounds were similar to other molecules inhibitors of the P2X7R described in the literature (North 2002; Rech et al. 2016). The compounds NO-01 and NO-12 also inhibited BzATP-induced dye uptake (data not shown) with similar IC₅₀ values observed for ATP-induced dye uptake. Therefore, NO-03, NO-05, NO-06, NO07, NO-11, NO-13, NO-04 and NO-08 were discarded because of the reduced potency when compared to commercial P2X7R inhibitors. Contrarily, compounds NO-01 and NO-12 were tested in all complementary assays.

Dose-response curve measuring the compounds NO-01 and NO-12 toxic activity in mice peritoneal macrophages after 72 h of treatment. NO-01 and NO-12 caused low toxicity with high CC₅₀ value (Fig. 3, Table 2). Both compounds were less toxic than BBG and A740003 when treated in the same time of incubation. When selectivity index of these both arylboronic acids derivatives were compared with commercial P2X7R inhibitors, these analogs exhibited values higher than the P2X7R inhibitors (Table 2). NO-12 analog exhibited a S.I. similar to a selective P2X7R inhibitor, A740003. NO-01 analog showed a S.I. value 1.77 times higher than compound A740003 indicating an elevated promisor activity. Therefore, these arylboronic acid analogs were tested in the subsequent assays. Curiously, both compounds showed IC₅₀ values higher than P2X7R inhibitors previously described (Faria et al. 2018; Pacheco et al. 2018; Kwak et al. 2018; O'Brien-Brown et al. 2017), however in function of elevated S.I. value for human P2X7R, these arylboronic analogs remain as good candidates.

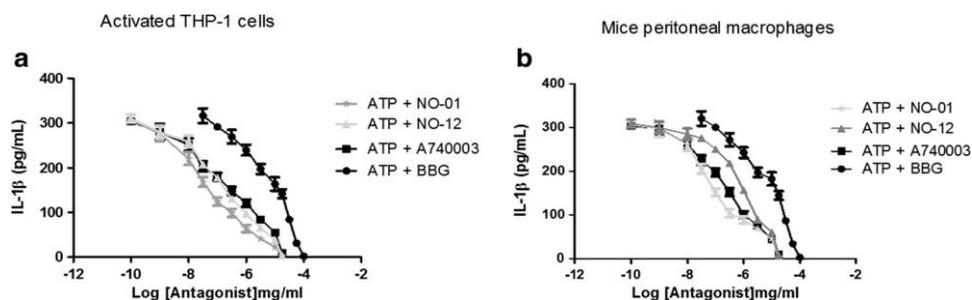


Fig. 4 ATP-induced IL-1 β release inhibition by arylboronic acids in human and mouse cells. (a) Differentiated THP-1 cells treated with 1 mM ATP (30 min) and LPS (4 h) in the presence of increasing concentrations of BBG, A740003, NO-01, or NO-12. (b) Mouse peritoneal macrophages treated with 1 mM ATP (30 min) and LPS

(4 h) in the presence of increasing concentrations of BBG, A740003, NO-01, and NO-12. Curves are representative of 3–5 independent experiments A740003.

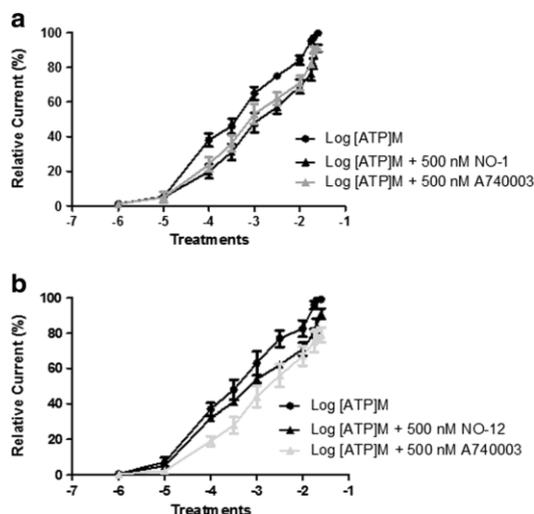


Fig. 5 Evaluation of the inhibitory mechanism of compounds NO-01 and NO-12 on P2X7R antagonists. Competitive mechanisms were evaluated by recording the ionic currents of mice peritoneal macrophages with (●) ATP alone or (■) with 500 ng/mL of NO-01(A) or NO-12 (B) at 37 °C. Graphics are representative of 3–4 independent experiments

Table 4 Liver microsomal stability and Caco-2 data for NO-01 and NO-12

Liver Microsomes	LM stability(a) mouse	LM stability(a) human	Caco-2(b)
NO-01	20.2	19.97	76.6 ± 1.8
NO-12	36.3	35.79	59.79 ± 1.7

(a) Stability in mice and human liver microsomes. Data reported as $CL_{int}(\mu\text{L} / \text{minutes} / \text{mg protein})$

(b) Apparent permeability values (P_{app}) measured using low permeability and high permeability absorption compounds, vinblastine and propranolol, respectively, as reference. Data are reported in 10^6 cm/s . These values indicate an apical to basolateral (A - B) direction. They were tested at the same time as NO-01 and NO-12. Values are means ± standard error of 3 experiments.

ATP-induced IL-1 β release is a characteristic function associated with P2X7R activation. Compound NO-01 potently inhibited ATP-induced IL-1 β release in mice and human P2X7R, however NO-12 weakly inhibited IL-1 β release mediated by mP2X7R activation. Human THP-1 monocytes differentiated with INF- γ and PMA were primed with LPS for 4 h, with ATP added in the last 30 min of LPS incubation. Both arylboronic acids derivatives were added 30 min before ATP addition inhibited ATP-induced IL-1 β release in a similar manner (Table 3). NO-01 and NO-12 exhibited higher potency than BBG and A740003 to inhibit IL-1 β release mediated by hP2X7R activation (Fig. 4a). ATP-induced IL-1 β release mediated by mouse P2X7R also was inhibited by arylboronic acid analogs (Fig. 4b and Table 3). NO-12 suffered a potency reduction to inhibit the mP2X7R when compared with hP2X7R. NO-01 maintained an elevated potency to inhibit mP2X7R with IC_{50} value higher than A740003 (Fig. 4, Table 3). Both analogs also inhibited BzATP-induced IL-1 β release (data not shown). These results indicate a selective inhibition mechanism inhibiting IL-1 β release mediated by P2X7R activation, as observed for other P2X7R antagonists (Rech et al. 2016; Volonté et al. 2012; Young and Górecki 2018).

A possible mechanism of action for arylboronic acid analogs inhibition was measured using whole cell patch clamp technique. ATP concentrations ranging from 100 μM to 25 mM induced macroscopic ionic currents in a doseresponse manner (Supplemental Fig. 1 and 2).

When arylboronic derivatives or A740003 were fixed at 500 nM and tested in the presence of ATP curve, NO-01 and NO-12 augmented the EC_{50} value for the ATP doseresponse curve in comparison with ATP concentrations alone (Fig. 5a, b).

Table 5 Solubility of NO-01 and NO-12 at various pH conditions

Compound	pH 2(a)	pH 4(b)	pH 7.4(c)	pH 10(d)
NO-01	250 μ M	250 μ M	< 250 μ M	< 250 μ M
NO-12	250 μ M	250 μ M	< 250 μ M	< 250 μ M

(a) pH 2: hydrochloride buffer; (b) pH 4: citrate buffer; (c) pH 7.4: phosphate buffer; (d) pH 10: sodium hydroxide buffer, n = 3 on distinct days

NO-01 and NO-12 compared to A740003, which is a P2X7R allosteric inhibitor acting on the pore allosteric site (Karasawa and Kawate 2016) showed action profiles similar (Figs. 5a, 4b). The ATP concentrations ranging from 10^{-4} to $10^{-1.6}$ were inhibited for NO-01 treatment (Supplemental Table 1), and NO-12 impaired ionic currents induced for ATP concentrations ranging from 10^{-3} to $10^{-1.7}$ (Supplemental Table 2).

This result indicates a P2X7R non-competitive inhibition mechanism for NO-01 and NO-12 in the allosteric site as well as the inhibitor A740003, or an irreversible interaction in the ATP binding site. This inhibitory mechanism is shared for other P2X7R antagonists recently discovered (Gonzaga et al. 2017; Faria et al. 2018; Pacheco et al. 2018).

In silico analysis

ADMET studies The in silico pharmacokinetics evaluation indicated that the two most active compounds (NO-01 and NO12) have a high permeability by the Human Intestinal Absorption test (Shen et al. 2010) with more than 70% being absorbed and a high permeability by the Caco-2 test (Pham The et al. 2011) with more than 8×10^{-6} cm/s. Also, high water solubility was estimated for both compounds in which the values of LogS -2.04 and -2.20 are suggested for compounds NO-1 and NO-12, respectively. On the other hand, only compound NO-01 showed a high permeability through the blood brain barrier.

The CYP enzyme metabolism profile was also investigated in which compounds NO-1 and NO-12 only presented potential interaction with the CYP3A4 as an inhibitor. In addition, it is known that the nitrile group in most drugs is not directly metabolized, because the nitrile group is eliminated through the body unchanged. Despite that, the epoxidation of alkenenitriles compounds (such the case of compounds NO01 and NO-12) can potentially liberate cyanide, although a large number of approved drug with alkenenitriles groups indicate that the metabolism at other sites is more likely (Fleming et al. 2010).

Table 6 Log D_{7.4} of NO-01 and NO-12 boronic tyrophostins

Compound	LogD _{7.4} (a)
NO-01	-2.25 \pm 0.09
NO-12	-0.96 \pm 0.11

(a) Results are average of three experiments and in all cases individual Log D values were within ± 0.3 log units of the average LogD Propranolol HC

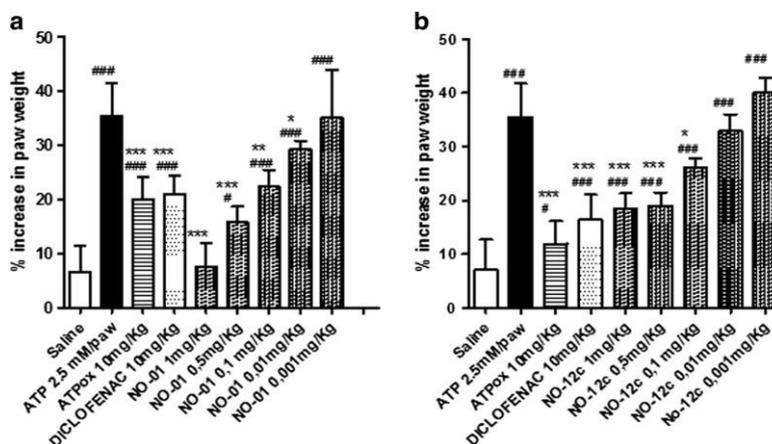


Fig. 6 Anti-inflammatory effects of NO-01 and NO-12 on ATP-induced paw edema in mice. Groups with five Swiss Webster mice were treated with ATP (intraplantar) or preincubated for 30 min with Diclofenac (10 mg/kg), oxidized ATP (10 mg/kg), or increasing doses of NO-01 (0.001–1 mg/kg) (a) or NO-12 (b). Paw edema was measured at 60 min after ATP application. These results represent three distinct days and are expressed as mean \pm s.d. #### $P < 0.05$ comparison in relation to saline group. *** $P < 0.05$ comparison in relation to ATP group

Regarding the toxicological parameter both compounds were labeled as weak inhibitor ($pIC_{50} \leq 6.0$ mol/L) of the Human Ether-a-go-go-Related Gene (hERG) Inhibition Test (Marchese Robinson et al. 2011), also both compounds showed low mutagenic potential by the AMES Test and finally none carcinogenic features were detected by Carcinogens Test (Lagunin et al. 2009).

Furthermore, no apparent toxicity is identified in the literature for the boronic acids moiety regarding medical applications. Indeed, the first boronic acid-based FDA approved drug, the Bortezomib (Velcade), a proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma, presented low toxicity issues. Additionally, the eventual final product in the metabolism of boronic acid-containing compounds is generally boric acid, which has low particularly toxic to humans (Cambre and Sumerlin 2011).

Solubility, microsomal stability, and permeability *in vitro*

Arylboronic acids NO-01 and NO-12 were moderately stable in mouse and human microsomes (Table 4). NO-01 when compared to NO-12 may exhibit a short duration of action *in vivo*. Additionally, NO-01 was permeable in Caco-2 at percentages above to 75% (Table 4) and NO-12 was permeable in a range superior to 55%, both when compared with propranolol.

Table 7 The Volume (\AA^3) of the Cavities Detected in the Human P2X7R Model using MVD

Cavity	Volume (\AA^3)
S1	2204.67
S2	1320.96
S3`	442.88
S3``	394.24
S3```	308.22

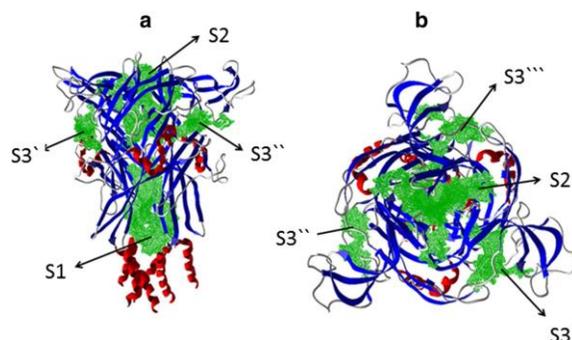


Fig. 7 Representation of the binding sites (S1, S2 and S3) identified in the P2X7R. Frontal view (a) and Top view (b). The cavities S1, S2 and S3 are ordered based on their volumes. Because there are three identical S3 binding sites formed by three identical subunits, they are labeled S3`, S3``, S3```

When solubilized in solutions with pH values ranging from 2 to 10, NO-01 demonstrated solubility in turn of 250 μM (Table 5). $\text{LogD}_{7.4}$ measured for NO-01 gave a value of -2.25 ± 0.09 indicating good solubility in

aqueous solutions (Table 6). In relation to NO-12, it demonstrated solubility at concentrations above 250 μM (Table 5). The $\text{LogD}_{7.4}$ value for NO-12 was -0.96 ± 0.11 (Table 6).

NO-01 reduced lipophilicity may be associated with short microsomal stability, however this characteristic can increase the tissue permeability as observed in Caco-2 cells. In contrast, NO-12 although lipophilic exhibited higher microsomal stability and reduced tissue permeability.

***In vivo* assays**

NO-01 and NO-12 anti-inflammatory properties *in vivo* was evaluated using the ATP- induced paw edema model in mice. Sodium diclofenac and arylboronic acids were administered intraperitoneally at 1 h before ATP treatment for 30 min. The oxidized ATP, an irreversible P2X7R antagonist inhibited the ATP-induced inflammatory response (NO-01, Fig. 6a and NO- 12, Fig. 6b). Sodium diclofenac, a general anti-inflammatory, also inhibited ATP-induced paw edema (Fig. 6). NO-01 and NO-12 dose-dependently inhibited the ATP effect (Fig. 6b). In this context, NO-01 promoted an anti-inflammatory effect more potent than oxidized ATP and diclofenac (Fig. 6a). In accordance with *in vitro* assays, NO-01 inhibited the ATP-induced paw edema with higher potency compared to the NO-12 analog. Triazole and naphthoquinone derivatives inhibiting P2X7R activity also reduced the ATP-induced paw edema (Gonzaga et al., 2017, Faria et al. 2018). In both papers, at least one dose administered reducing edema formation in $\mu\text{g}/\text{kg}$ concentrations as observed mainly for NO-01. These arylboronic acid analogs also inhibited carrageenan-induced response in similar manner to ATP stimulation (data not shown).

Molecular docking

The blind molecular docking of the two most active ligands (NO-01 and NO-12), on the ionic channel P2X7R, were performed around the area where the cavities were identified in the protein molecular structure (Fig. 7). In order to harness structure activity relationship, the same blind molecular docking was performed with less active ligands (NO-06 and NO-13). The largest volume cavity is the S1 located into the P2X7 pore comprised by the lower body domain of the three correlated subunits; the second largest volume cavity is the S2, also located in the pore, but in the upper body domain and; the cavities S3', S3'' and S3''' are the ATP-binding sites located between the protein subunits. Figure 7 depicts the cavities identified in the P2X7R and the Table 7 indicates the volume of each cavity.

The molecular docking results indicated that the cavity S2 was the most favorable binding site of the inhibitors NO-01 NO-12, NO-06 and NO-13. The S2 cavity is the same cavity revealed in the work from Karasawa and Kawate (2016) where the five known P2X7 inhibitors bind (A740003, A804598, AZ10606120, GW791343, JNJ47965567), based on the elucidation of the panda P2X7R complexed crystal structures.

All the four NO compounds presented a similar binding mode into the S2 cavity, with their phenyl moiety interacting with the phenylalanine residues 95, 103 and 293 from chain B. Also the boronic acid group from the inhibitors NO-01, NO12 and NO-13 are orientated towards the serine 101 lateral chain from chain B (Fig. 8). Some residues interactions with the NO compounds are similar to the known allosteric inhibitors identified from the Karasawa and Kawate (2016) work, as the phenylalanines 95, 103 and 293 are also involved in hydrophobic interactions. In addition, the residue Met105 that performs hydrophobic interactions with the compounds A740003, A804598 and JNJ47965567 is also interacting with the compound NO-06. Despite the fact that all four NO compounds submitted to molecular docking studies presented similar hydrophobic interactions with the phenylalanine residues, the hydrogen bond formation with the residues Gln98, Leu97 and specially with the Ser101 might be responsible for the gain in the activity of the compounds NO-01 and NO-12 compared with the compounds NO-06 and NO-13. Also, the inhibitor NO-12 presented extra hydrogen bonds with the residues glycine 98 and 99 from chain A, which might contribute for selectivity. Figure 9 depicts the intermolecular interaction of the NO compounds into de S2 binding cavity found by molecular docking.

Though the molecular docking results indicate the probable binding site of NO series compounds in the human P2X7R model and suggest that interactions of the boronic acid moiety with Ser101 and Gln98 may be determinant to high affinity of the compounds NO-01 and NO-12, other studies in future should be done to refine these insights in order to increase the information on the properties and inhibitory activity of the boronic acids derivatives on the P2X7R,

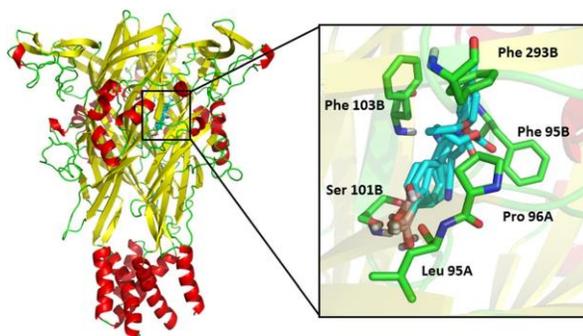


Fig. 8 Superposition of the inhibitors NO-01, NO-12, NO-06 and NO-13 docked into the S2 cavity. In blue are depicted the NO derivatives and in green the main residues that are in close contact

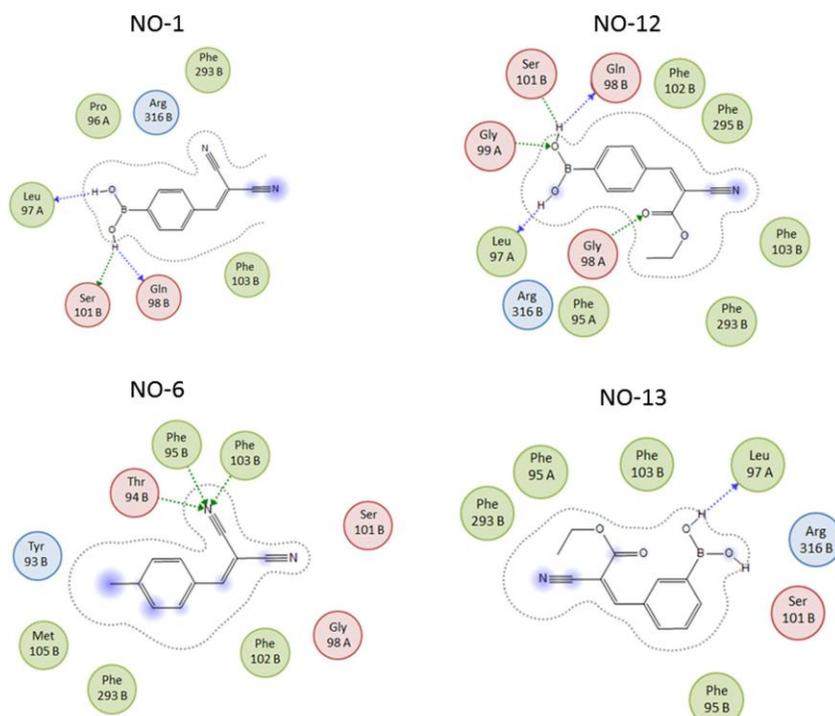


Fig. 9 Representation of the main intermolecular interactions of each NO compounds into the S2 binding cavity, identified from the molecular docking. The arrows indicate hydrogen bonds and the blue areas in the NO structures indicate solvent exposure

Conclusion

In summary, the results exhibited herein demonstrate arylboronic acids as a novel P2X7R inhibitors class. NO-01 and NO-12 compounds ATP antagonistic effects resulted in potent blockage of mouse and human P2X7R. The arylboronic acid NO-01 was more potent *in vitro* and *in vivo* when compared with BBG and A740003 to reduce P2X7R activity and the inflammatory response. In accordance with *in silico* ADMET analysis both molecules depicted an acceptable pharmacokinetic profile and low toxicological effects, thus suggesting its potential drug-likeness characteristic. The molecular docking results suggest that the binding sites for the compounds NO-01 and NO-12 are located in the upper area of P2X7R pore. Thus, these results strengthen the therapeutic potential and the feasibility of developing new P2X7R inhibitors based on the arylboronic acid pharmacophore group.

Acknowledgements CAPES, CNPq, FAPERJ, UFRJ, UFF.

Funding This work was supported by CNPq (National Council of Research of Brazil) (Fellowship Process Number 304716/2014–6).

Compliance with ethical standards

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Ahmed V, Liu Y, Silvestro C, Taylor SD (2006) Boronic acids as inhibitors of steroid sulfatase. *Bioorg Med Chem* 14:8564–8573. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.08.033>
- Allsopp RC, Dayl S, Schmid R, Evans RJ (2017) Unique residues in the ATP gated human P2X7 receptor define a novel allosteric binding pocket for the selective antagonist AZ10606120. *Sci Rep* 7:725
- Asano T, Nakamura H, Uehara Y, Yamamoto Y (2004) Design, synthesis, and biological evaluation of aminoboronic acids as growth-factor receptor inhibitors of EGFR and VEGFR-1 tyrosine kinases. *Chembiochem Eur J Chem Biol* 5:483–490. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300748>
- Baas T (2012) Paradoxical P2X7. *Sci-Bus Exch* 5:512–512. <https://doi.org/10.1038/scibx.2012.512>
- Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang Y-K, Hernandez V, Xia Y (2009) Therapeutic potential of boron-containing compounds. *Future Med Chem* 1:1275–1288. <https://doi.org/10.4155/fmc.09.71>
- Ban HS, Nakamura H (2015) Boron-based drug design. *Chem Rec N Y N* 15:616–635. <https://doi.org/10.1002/tcr.201402100>
- Ban HS, Usui T, Nabeyama W, Morita H, Fukuzawa K, Nakamura H (2009) Discovery of boron-conjugated 4-anilinoquinazoline as a prolonged inhibitor of EGFR tyrosine kinase. *Org Biomol Chem* 7:4415–4427. <https://doi.org/10.1039/b909504g>
- Bartlett R, Stokes L, Sluyter R (2014) The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. *Pharmacol Rev* 66:638–675. <https://doi.org/10.1124/pr.113.008003>
- Baudelet D, Lipka E, Millet R, Ghinet A (2015) Involvement of the P2X7 purinergic receptor in inflammation: an update of antagonists series since 2009 and their promising therapeutic potential. *Curr Med Chem* 22:713–729
- Bhattacharya B, Maity DK, Pachfule P, Colacio E, Ghoshal D (2014) Syntheses, X-ray structures, catalytic activity and magnetic properties of two new coordination polymers of Co(II) and Ni(II) based on benzenedicarboxylate and linear N,N'-donor Schiff base linkers. *Inorg Chem Front* 1:414–425. <https://doi.org/10.1039/c4qi00032c>
- Bradke TM, Hall C, Carper SW, Plopper GE (2008) Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability. *Cell Adhes Migr* 2:153–160
- Buac D, Shen M, Schmitt S, Kona FR, Deshmukh R, Zhang Z, NeslundDudas C, Mitra B, Dou QP (2013) From bortezomib to other inhibitors of the proteasome and beyond. *Curr Pharm Des* 19:4025–4038
- Burnstock G, Knight GE (2018) The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signal* 14:1–18. <https://doi.org/10.1007/s11302-0179593-0>
- Cabello JA, Campelo JM, Garcia A, Luna D, Marinas JM (1984) Knoevenagel condensation in the heterogeneous phase using aluminum phosphate-aluminum oxide as a new catalyst. *J Org Chem* 49: 5195–5197. <https://doi.org/10.1021/jo00200a036>
- Cambre JN, Sumerlin BS (2011) Biomedical applications of boronic acid polymers. *Polymer* 52:4631–4643. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.07.057>
- Caseleya EA, Muencha SP, Fishwick CW, Jiang L (2016) Structurebased identification and characterisation of structurally novel human P2X7 receptor antagonists. *Biochem Pharmacol* 116(15):130–139
- Chen Z, He L, Li L, Chen L (2018) The P2X7 purinergic receptor: an emerging therapeutic target in cardiovascular diseases. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 479:196–207. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.01.032>
- Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G, Lee PW, Tang Y (2012) admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J Chem Inf Model* 52:3099–3105. <https://doi.org/10.1021/ci300367a>
- Das BC, Thapa P, Karki R, Schinke C, Das S, Kambhampati S, Banerjee SK, Van Veldhuizen P, Verma A, Weiss LM, Evans T (2013) Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. *Future Med Chem* 5:653–676. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.38>
- de Resende Filho JBM, Pires GP, de Oliveira Ferreira JMG, Teotonio EES, Vale JA (2017) Knoevenagel condensation of aldehydes and ketones with Malononitrile catalyzed by amine compounds-tethered Fe3O4@SiO2 nanoparticles. *Catal Lett* 147:167–180. <https://doi.org/10.1007/s10562-016-1916-1>
- Deb, M.L., Bhuyan, P.J., 2005. Uncatalysed Knoevenagel condensation in aqueous medium at room temperature - PDF free download [WWW document]. *Tetrahedron Lett.* URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004040390501631X> (accessed 9.20.18)
- Diaz DB, Yudin AK (2017) The versatility of boron in biological target engagement. *Nat Chem* 9:731–742. <https://doi.org/10.1038/nchem.2814>
- Dimitrova P, Ivanovska N (2013) Tyrphostins as a promising therapeutic tool in inflammation-related conditions. *OA Inflamm* 1. <https://doi.org/10.13172/2052-787X-1-1-608>
- Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Surber B, Vaidyanathan SX, PerezMedrano A, Wang Y, Carroll WA, Jarvis MF (2009) [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharm*. 56:223–229

- Dou QP, Zonder JA (2014) Overview of proteasome inhibitor-based anticancer therapies: perspective on bortezomib and second generation proteasome inhibitors versus future generation inhibitors of ubiquitin-proteasome system. *Curr. Cancer Drug Targets* 14:517– 536
- Faria RX, Freitas HR, Reis RAM (2017) P2X7 receptor large pore signaling in avian Müller glial cells. *J Bioenerg Biomembr* 49:215– 229. <https://doi.org/10.1007/s10863-017-9717-9>
- Faria RX, Oliveira FH, Salles JP, Oliveira AS, von Ranke NL, Bello ML, Rodrigues CR, Castro HC, Louvis AR, Martins DL, Ferreira VF (2018) 1,4-naphthoquinones potently inhibiting P2X7 receptor activity. *Eur J Med Chem* 143:1361– 1372. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.033>
- Fleming FF, Yao L, Ravikumar PC, Funk L, Shook BC (2010) Nitrilecontaining pharmaceuticals: efficacious roles of the nitrile pharmacophore. *J Med Chem* 53:7902–7917. <https://doi.org/10.1021/jm100762r>
- Gonzaga DTG, Gomes LB, Costa TEMC, von Ranke NL, Pacheco PAF, Simões APS, Arruda JC, Dantas LP, de Freiras HR, Reis RA, Penido C, Bello ML, Castro HC, Rodrigues CRR, Ferreira VF, Faria RX, Silva FC (2017) 1-Aryl-1H- and 2-aryl-2H-1,2,3-triazole derivatives blockade P2X7 receptor in vitro and inflammatory response in vivo. *Eur J Med Chem* 139:698– 717. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.034>
- Gorodeski GI (2012) P2X7 receptors and epithelial cancers. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal* 1:349–371. <https://doi.org/10.1002/wmts.33>
- Groziak MP (2001) Boron therapeutics on the horizon. *Am J Ther* 8:321– 328
- Gyurkovska V, Stefanova T, Dimitrova P, Danova S, Tropcheva R, Ivanovska N (2014) Tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 retards chronic joint inflammation in mice. *Inflammation* 37:995– 1005. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9820-6>
- Halgren TA (1996) Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem* 17:490–519. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6<490::AID-JCC1>3.0.CO;2-P)
- Hiller N d J, Silva NAAE, Faria RX, Souza ALA, Resende JALC, Borges Farias A, Correia Romeiro N, de Luna Martins D (2018) Synthesis and evaluation of the anticancer and Trypanocidal activities of Boronic Tyrphostins. *ChemMedChem* 13:1395–1404. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800206>
- Humphreys, B.D., Virginio, C., Surprenant, A., Rice, J., Dubyak, G.R., 1998. Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol Pharmacol*. Jul;54(1):22-32
- Jiang LH, MacKenzie AB, North RA, Surprenant A (2000) BBG selectively blocks ATP-gated rat P2X7 receptors. *Mol Pharmacol* 58:82–88
- Karasawa A, Kawate T (2016) Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.22153>
- Kim M, Jiang LH, Wilson HL, North RA, Surprenant A (2001) Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J* 20:6347–6358. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6347>
- Koehler KA, Lienhard GE (1971) 2-phenylethaneboronic acid, a possible transition-state analog for chymotrypsin. *Biochemistry* 10:2477– 2483
- Kumar SK, Hager E, Pettit C, Gurulingappa H, Davidson NE, Khan SR (2003) Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *J Med Chem* 46:2813–2815. <https://doi.org/10.1021/jm030213+>
- Kwak SH, Shin S, Lee JH, Shim JK, Kim M, Lee SD, Lee A, Bae J, Park JH, Abdelrahman A, Müller CE, Cho SK, Kang SG, Bae MA, Yang JY, Ko H, Goddard WA, Kim YC (2018) Synthesis and structureactivity relationships of quinolinone and quinoline-based P2X7 receptor antagonists and their anti-sphere formation activities in glioblastoma cells. *Eur J Med Chem* 151:462–481
- Lagunin A, Filimonov D, Zakharov A, Xie W, Huang Y, Zhu F, Shen T, Yao J, Poroikov V (2009) Computer-aided prediction of rodent carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. *QSAR Comb Sci* 28:806–810. <https://doi.org/10.1002/qsar.200860192>
- LeBeau AM, Singh P, Isaacs JT, Denmeade SR (2008) Potent and selective peptidyl Boronic acid inhibitors of the serine protease prostate-specific antigen. *Chem Biol* 15:665–674. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.020>
- Li G, Xiao J, Zhang W (2011) Knoevenagel condensation catalyzed by a tertiary-amine functionalized polyacrylonitrile fiber. *Green Chem* 13:1828–1836. <https://doi.org/10.1039/C0GC00877J>
- Marchese Robinson RL, Glen RC, Mitchell JBO (2011) Development and comparison of hERG blocker classifiers: assessment on different datasets yields markedly different results. *Mol Inform* 30:443– 458. <https://doi.org/10.1002/minf.201000159>
- Matthews DA, Alden RA, Birktoft JJ, Freer ST, Kraut J (1975) X-ray crystallographic study of boronic acid adducts with subtilisin BPN' (novo). A model for the catalytic transition state *J Biol Chem* 250: 7120–7126
- Mehta N, Kaur M, Singh M, Chand S, Vyas B, Silakari P, Bahia MS, Silakari O (2014) Purinergic receptor P2X₇: a novel target for antiinflammatory therapy. *Bioorg Med Chem* 22:54–88. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.10.054>
- Modzelewska A, Pettit C, Achanta G, Davidson NE, Huang P, Khan SR (2006) Anticancer activities of novel chalcone and bis-chalcone derivatives. *Bioorg Med Chem* 14:3491–3495. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.003>

- Mukhopadhyay C, Datta A (2008) A simple, efficient and green procedure for the Knoevenagel condensation of aldehydes with N-Methylpiperazine at room temperature under solvent-free conditions. *Synth Commun* 38:2103–2112. <https://doi.org/10.1080/00397910802029364>
- Nakamura H, Kuroda H, Saito H, Suzuki R, Yamori T, Maruyama K, Haga T (2006) Synthesis and biological evaluation of boronic acid containing cis-stilbenes as apoptotic tubulin polymerization inhibitors. *ChemMedChem* 1:729–740. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600068>
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82:1013–1067. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2002>
- O'Brien-Brown, J., Jackson, A., Reekie, T.A., Barron, M.L., Werry, E.L., Schiavini, P., McDonnell, M., Munoz, L., Wilkinson, S., Noll, B., Wang, S., Kassiou, M., 2017. Discovery and pharmacological evaluation of a novel series of adamantyl cyanoguanidines as P2X7 receptor antagonists. *Eur J Med Chem*. Apr 21;130:433-439
- Pacheco PAF, Galvão RMS, Faria AFM, von Ranke NL, Rangel MS, Ribeiro TM, Bello ML, Rodrigues CF, Ferreira VF, da Rocha DR, Faria RX (2018) 8-Hydroxy-2-(1H-1,2,3-triazol-1-yl)-1,4-naphthoquinone derivatives inhibited P2X7 Receptor-Induced dye uptake into murine Macrophages. *Bioorg Med Chem* 27:1449–1455
- Pham The H, González-Álvarez I, Bermejo M, Mangas Sanjuan V, Centelles I, Garrigues TM, Cabrera-Pérez MÁ (2011) In silico prediction of Caco-2 cell permeability by a classification QSAR approach. *Mol. Inform.* 30:376–385. <https://doi.org/10.1002/minf.201000118>
- Philipp M, Bender ML (1971) Inhibition of serine proteases by arylboronic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:478–480
- Rech JC, Bhattacharya A, Letavic MA, Savall BM (2016) The evolution of P2X7 antagonists with a focus on CNS indications. *Bioorg Med Chem Lett* 26:3838–3845. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.06.048>
- Ren Y, Cai C (2007) Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes with active methylene compounds using a catalytic amount of iodine and K_2CO_3 at room temperature. *Synth Commun* 37:2209–2213. <https://doi.org/10.1080/00397910701397375>
- Rocha GB, Freire RO, Simas AM, Stewart JJP (2006) RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *J Comput Chem* 27:1101–1111. <https://doi.org/10.1002/jcc.20425>
- Savio LEB, de Andrade Mello P, da Silva CG, Coutinho-Silva R (2018) The P2X7 receptor in inflammatory diseases: angel or demon? *Front Pharmacol* 9:52. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00052>
- Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung L-P, Skarratt KK, Saunders BM, Tan KS, Gu BJ, Fuller SJ, Britton WJ, Petrou S, Wiley JS (2006) AThr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X7 function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem* 281:2079–2086. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507816200>
- Shen J, Cheng F, Xu Y, Li W, Tang Y (2010) Estimation of ADME properties with substructure pattern recognition. *J Chem Inf Model* 50:1034–1041. <https://doi.org/10.1021/ci100104j>
- Shimizu K, Maruyama M, Yasui Y, Minegishi H, Ban HS, Nakamura H (2010) Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 1453–1456. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.037>
- Skaper SD (2011) Ion channels on microglia: therapeutic targets for neuroprotection. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 10:44–56
- Suenaga H, Nakashima K, Mikami M, Yamamoto H, James TD, Sandanayake KRAS, Shinkai S (1996) Screening of arylboronic acids to search for a strong inhibitor for γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP). *Recl Trav Chim Pays-Bas-J R Neth* 115:44–48
- Sugiyama T (2014) Role of P2X7 receptors in the development of diabetic retinopathy. *World J Diabetes* 5:141–145. <https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i2.141>
- Swain M (2012) Chemicalize.Org/chemicalize.Orgby ChemAxon Ltd. *J Chem Inf Model* 52:613–615. <https://doi.org/10.1021/ci300046g>
- Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: a new technique for high accuracy molecular docking. *J Med Chem* 49:3315–3321. <https://doi.org/10.1021/jm051197e>
- Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2010) Pain and purinergic signaling. *Brain Res Rev* 63:222–232. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.003>
- Volonté C, Apolloni S, Skaper SD, Burnstock G (2012) P2X7 receptors: channels, pores and more. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 11: 705–721
- Wang S, Ren Z, Cao W, Tong W (2001) The Knoevenagel condensation of aromatic aldehydes with Malononitrile or ethyl Cyanoacetate in the presence of Ctmab in water. *Synth Commun* 31:673–677. <https://doi.org/10.1081/SCC-100103255>
- Weston GS, Blázquez J, Baquero F, Shoichet BK (1998) Structure-based enhancement of boronic acid-based inhibitors of AmpC β -lactamase. *J Med Chem* 41:4577–4586. <https://doi.org/10.1021/jm980343w>
- Young CNJ, Górecki DC (2018) P2RX7 Purinoceptor as a therapeutic target-The second coming? *Front Chem* 6:248. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00248>
- Zervosen A, Sauvage E, Frère J-M, Charlier P, Luxen A (2012) Development of new drugs for an old target: the penicillin binding proteins. *Mol Basel Switz* 17:12478–12505. <https://doi.org/10.3390/molecules171112478>