JULIANA MARIA DE LIMA

Ensaio enzimático *on-line* baseado em enzimas imobilizadas e cromatografia zonal para identificação e caracterização de inibidores da enzima Nucleosídeo Difosfato Quinase B

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

Ribeirão Preto

2018

RESUMO

LIMA, Juliana Maria de. **Ensaio enzimático *on-line* baseado em enzimas imobilizadas e cromatografia zonal para identificação e caracterização de inibidores da enzima Nucleosídeo Difosfato Quinase B**. 2018. 162f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As enzimas desempenham papel fisiológico fundamental nos organismos, seja em condições normais e patológicas, o que as tornam atrativos alvos para intervenções terapêuticas. Pequenas moléculas capazes de inibir enzimas alvos são utilizadas para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, câncer, AIDS, entre outras. Contudo, a identificação de pequenas moléculas inibidores ainda é uma etapa limitante no desenvolvimento de fármacos. Nesse contexto, o aprimoramento e novos ensaios robustos e confiáveis para acelerar a descoberta e a caracterização de novos inibidores é de extrema relevância. Nesta tese apresentamos o desenvolvimento de apropriados métodos para a quantificação direta da atividade das enzimas alvos Nucleosídeo Difosfato Quinase B (NDPKb), humana (NME2) e de *Leishmania major* (*LmNDPKb*), livres em solução ou imobilizadas em colunas capilares (ICER). A separação dos produtos e substratos da reação foi realizada por cromatografia de par iônico, que possibilitou a quantificação direta da atividade enzimática da NDPKb livre em solução, método *off-line*. Já para a quantificação da atividade das enzimas imobilizadas foi elaborado um método *on-line*, no qual a reação enzimática do ICER foi transferida à coluna analítica, permitindo a separação e quantificação da atividade de fosfotransferência. Utilizando esses métodos foi possível determinar o pH ótimo e os parâmetros cinéticos das enzimas livres e imobilizadas. Inibidores de NDPKb de diferentes potências e mecanismos de ação foram utilizados para modulação do sistema ICER-LC-UV como ensaio de triagem de inibidores. O (-)-Epicatequina galato (ECG) foi utilizado como prova de conceito, para validar a aplicação do método *on-line* na identificação e caracterização de inibidores para as enzimas alvo NME2 e *LmNDPKb*. Em suma, a quantificação direta associada ao uso de enzimas imobilizadas representa um grande avanço aos métodos consolidados para o monitoramento da atividade enzimática e triagem de inibidores das enzimas alvo.

Palavras-chave: Imobilização de enzimas. Enzimas alvo farmacológico. Triagem de inibidores. Inibidores de quinase. Enzima ping-pong

ABSTRACT

LIMA, Juliana Maria de. **Enzymatic on-line assay based on immobilized enzyme coupled to zonal chromatography to identify and characterize inhibitors for Nucleoside Diphosphate Kinase B**. 2018. 162f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Química – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Enzymes play a key physiological role in organisms, either under normal or pathological conditions, which make them attractive targets for therapeutic interventions. Small molecules capable to inhibit specific target enzymes are used for the treatment of several inflammatory diseases, cancer, AIDS, among others. However, identifying small inhibitory molecules is still a limiting step in drugs discovery. In this context, the improvement and development of robust and reliable novel assays to accelerate the discovery and characterization of new inhibitors have become extremely relevant. This study describes an appropriate direct method to quantify the enzymatic activity of Nucleoside Diphosphate Kinase B (NDPKb) from human (NME2) and *Leishmania major* (*LmNDPKb*). It can be applied to free enzyme in solution or immobilized enzyme into silica capillary (ICER). The separation of both the substrates and products was achieved using ion-pair chromatography, it can be applied to direct quantification of free NDPKb activity, *off-line* method. In order to quantify the activity of the immobilized enzymes, an *on-line* method was developed. Initially, the enzymatic catalysis occurred into the ICER. Sequentially, the reaction mixture was transferred to an analytical column, where analytes were separated. From this method, it was possible to determine the optimum pH and kinetic parameters for the immobilized enzymes. Well established NDPKb inhibitors with different strength and mechanisms of action were used to modulate the *on-line* method as an inhibitor screening assay. (-)-Epicatechin gallate was used as proof of concept in order to validate the application of the *on-line* method to identify and characterize the target's enzymes NME2 and *LmNDPKb* inhibitors. In summary, the direct quantification method coupled to the immobilized enzymes increases the likelihood of identifying the enzymatic activity and screening of inhibitors of the target enzymes when compared methods well described in the literature.

Keywords: Enzyme Immobilization. Therapeutic target enzymes. Inhibitors screening. Kinase inhibitors. Enzymes ping-pong

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1. Enzimas como alvos terapêuticos	13
2.2. Proteínas Quinases.....	14
2.2.1. Nucleosídeo difosfato quinase humana – Alvo 1	18
2.2.2. NDPK de Leishmania major – Alvo 2.....	22
2.3. Inibidores enzimáticos para a NDPK.....	26
2.4. Métodos para quantificar a atividade da enzima NDPK	28
2.5. Enzimas Imobilizadas.....	29
2.6. Enzimas imobilizadas para a triagem e caracterização de inibidores	32
2.6.1. Cromatografia de eluição zonal	33
2.6.2. Cromatografia frontal	34
2.7. Características intrínsecas das enzimas e tratamento matemático	35
2.8. Cinética do estado estacionário	38
2.8.1. Cinética do estado estacionário para o mecanismo ping-pong	39
2.9. Caracterização das diferentes modalidades de inibidores	42
3. JUSTIFICATIVA	49
4. OBJETIVOS.....	52
4.1. Geral	52
4.2. Objetivos específicos	52
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O avanço tecnológico e científico nas áreas de química e biologia, permitiram uma melhor compreensão das vias bioquímicas, dos alvos moleculares e suas funções em condições fisiológicas normais e patológicas. O entendimento desses processos viabilizou a descoberta de intervenções terapêuticas inovadoras, proporcionando significativas melhorias na qualidade de vida das pessoas¹. Nesse âmbito, as enzimas ocupam papel de destaque como alvos para intervenções terapêuticas, pois são vitais em processos patofisiológicos, são suscetíveis a inibição por moléculas de pequeno peso molecular e são convenientes para estratégias de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*) ou baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*).².

A identificação de inibidores de enzimas alvos é frequentemente realizada através de ensaios de triagem de alta performance, os chamados HTS (do inglês, *high-throughput screening*). Os ensaios HTS possibilitam a triagem de milhares de compostos em um curto espaço de tempo (50-1000 moléculas/dia), entretanto, sabe-se que estes ensaios comumente apresentam diversas variações, seja em termos tecnológicos (efeito do lote dos reagentes, placa e posição), ou biológico (presença de inibidores ou aglutinantes não seletivos) que podem originar em resultados falsos positivos tanto em relação a efetividade da inibição, quanto ao tipo de mecanismo de ação^{3,4}. Dessa forma, os ensaios enzimáticos *in vitro* ainda são uma etapa limitante, e adequações ou alternativas aos ensaios HTS são primordiais para a identificação desses novos hits como candidatos a fármacos, bem como a caracterização desses em termos de afinidade, especificidade e mecanismo de ação.

Neste trabalho nós apresentamos o desenvolvimento de um método *on-line* em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para o monitoramento da atividade da enzima alvo. Esse método foi conduzido utilizando um sistema de cromatografia zonal bidimensional, em que a primeira dimensão foi constituída de uma coluna de bioafinidade - em que a enzima alvo foi imobilizada na fase estacionária -, seguida de uma coluna analítica para separação do conteúdo reacional. O intuito de elaborar o método *on-line* foi facilitar e acelerar a triagem, identificação e caracterização de inibidores para as enzimas alvo. Para este trabalho foram

selecionadas as enzimas Nucleosídeo Difosfato Quinase B humana (NME2) e de *Leishmania major* (LmNDPKb).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Enzimas como alvos terapêuticos

Enzimas são macromoléculas que atuam como biocatalisadores permitindo que as reações biológicas ocorram em tempo hábil à propagação da vida. A ação dessas biomoléculas pode ser categorizada em termos de estrutura, função e mecanismo de catálise. As propriedades intrínsecas das enzimas como atividade, seletividade e especificidade garantem à essas macromoléculas a capacidade de catalisar processos químicos sob condições experimentais e ambientais brandas.

Assim como desempenham papel fisiológico fundamental, as enzimas também são essenciais em diversos mecanismos patofisiológicos. Por esta razão, a medicina moderna tem explorado essas macromoléculas como alvos para uma série de doenças, e o resultado é a alta representatividade de fármacos em uso clínico como antivirais, anticâncer, antibióticos e antiparasitários que atuam como inibidores enzimáticos (Tabela 1) ⁵. A interação enzima-inibidor frequentemente ocorre no sítio ativo ou em cavidades espalhadas pela estrutura tridimensional (3D) da proteína, denominados sítios alostéricos. Essas interações podem ser reversíveis, em que prevalece interações como interações eletrostáticas, forças de Van der Waals, ligação de hidrogênio ou forças hidrofóbicas, ou irreversíveis, em que os inibidores comumente se ligam à enzima através de ligações covalentes.

Os recentes avanços em engenharia genética e tecnológico como o sequenciamento de ácidos nucleicos, genotipagem, espectrometria de massas de metabólitos ou de proteínas intactas expandiram o conhecimento em relação aos processos patofisiológicos, bem como ocasionou uma divulgação de novos alvos terapêuticos, e uma melhor compreensão das interações biológicas desses alvos com outras enzimas, receptores ou ligantes. Recentemente, foi publicada a plataforma *Open Targets Platform* que fornece evidências sobre a associação de alvos terapêuticos com diversas doenças, a fim de promover a integração das informações de diversas fontes de dados para facilitar o processo de identificação e validação de alvos terapêuticos ⁶.

Tabela 1. Inibidores de enzimas alvo disponíveis para uso clínico

Fármaco	Enzima Alvo	Indicação clínico
Acetazolamina	Anidrase carbônica	Glaucoma
Aciclovir	DNA polimerase viral	Herpes
Amprenavir, nelfinavir	HIV protease	AIDS
Amoxicilina	Proteínas de ligação à penicilina	Infecção bacteriana
Alopurinol	Xantina oxidase	Gota
Argotroban	Trombina	Doenças cardíacas
Aspirina	Ciclooxigenases	Inflamação, dor, febre
Bortozemibe	Proteassoma	Câncer
Captopril, elanapril	Enzima conversora de angiotensina	Hipertensão
Carbidopa	Dopa decarboxilase	Parkinson
Clavulanato	β -Lactamase	Infecção bacteriana
Clopidogrel	Receptores plaquetários P2Y12 receptor	Prevenção de trombose
CI-1040, PD0325901	MAP quinase	Câncer
Digoxina	ATPase (sódio e potássio)	Doenças cardíacas
Efavirenz, nevirapina	Transcriptase reversa do HIV	AIDS
Epristerida, finasterida, dutasterida	5 α -Redutase esteroideal	Hiperplasia benigna da próstata, calvície masculina padrão
Fluorouracil	Timidilato sintase	Câncer
Galantamina	Colinesterase	Doença de Alzheimer
Imatinib	Tirosina quinase	Câncer
Leflunomida	Diidroorotato desidrogenase	Inflamação
Metotrexato	Diidrofolato redutase	Câncer, imunossupressão
Nitecapona	Catecol-O-metiltransferase	Parkinson
Norfloxacina	DNA girase	Infecções bacterianas do trato urinário
N-(fosfoacetil)-L-aspartato	Aspartato transcarbamoilase	Câncer
Omeprazol	ATPase	Úlceras gástricas
Oseltamivir	Neuraminidase	Anti-viral
Rofecoxibe	Ciclooxigenase 2	Inflamação
Sildenafil	Diidrofolato redutase	Disfunções eréteis
Sorbinol	Aldose redutase	Retinopatia diabética
Trimetoprim	Fosfodiesterase	Infecções bacterianas
Triclosan	Enoil-acil proteína-carreadora redutase	Agente antisséptico
Sildenafil, vardenafila	Fosfodiesterase	Disfunções eréteis

FONTE: Adaptado e expandido de Copeland 2013 ⁵

Os avanços técnico-científicos também permitiram uma investigação mais aprofundada e melhor entendimento das modificações pós-traducionais, tais como fosforilação, glicosilação, ubiquitinação, acetilação, metilação, lipidação e proteólises, que são conhecidas por aumentar a diversidade proteômica e influenciar vários aspectos fisiológicos em condições normais ou patológicas ⁷⁻⁹. Por esta razão, enzimas envolvidas nesses processos de modificações, como as proteínas quinases, têm sido extensivamente estudadas e exploradas para intervenções terapêuticas.

2.2. Proteínas Quinases

Proteínas quinases promovem reações de fosforilação pela transferência de um grupo γ -fosfato do ATP para o grupo hidroxila de uma variedade de substrato

incluindo lipídeos, açúcares ou aminoácidos ^{9,10}. Contudo, apesar de todas as quinases catalisarem essencialmente a mesma reação, essas enzimas podem ser divididas em grupos e estes subdivididos em famílias de acordo com a diversidade estrutural, a especificidade por determinado substrato e a quantidade de vias em que participam, como proposto por Cheek et al.(2002) ¹¹ e ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Classificação das quinases de acordo com o enovelamento e superfamílias

Grupo/Enovelamento	Superfamílias	Exemplos de atividade
Grupo I: Proteína Quinases / proteínas quinases atípicas / lipídeo quinases / ATP- <i>grasp</i>	a. Ser/Thr-Tyr proteína quinases e proteínas quinases atípicas	Ser/Thr-proteína quinase, Tyr- proteína quinase, colina quinase, fosforilase quinase, canamicina quinase, fosfatidilinositol 3-quinase, proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina, proteína Tau
	b. Lipídeo quinase	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5- quinase, fosfatidilinositol 3-quinase
	c. ATP- <i>grasp</i>	Piruvato, fosfato quinase
Grupo II: Rossman- <i>like</i>	a. P-loop quinases	Glicoquinase, timidina quinase, uridina quinase, fosfofrutoquinase-2
	b. Fosfoenolpiruvato carboxiquinase	Fosfoenolpiruvato carboxilase
	c. Fosfoglicerato quinase	Fosfoglicerato quinase
	d. Aspartoquinase	Carbamato quinase, aspartato quinase, acetilglutamato quinase
	e. Fosfofrutoquinase- <i>like</i>	Fosfofrutoquinase-1, NAD(+) quinase
	f. Riboquinase- <i>like</i>	Glukoquinase, riboquinase, adenosina quinase, inosina quinase
	g. Tiamina pirofosfoquinase	Tiamina pirofosfoquinase
Grupo III: Ferredoxina- <i>like</i>	a. Nucleosídeo difosfato quinase	Nucleosídeo difosfato quinase
	b. HPPK	HPPK
	c. Guanido quinase	Guanidoacetato quinase, creatina quinase, arginina quinase
	d. Histidina quinase	His-proteína quinase
Grupo IV: Ribonuclease H- <i>like</i>		Hexoquinase, glucoquinase, frutoquinase, glicerol quinase
Grupo V: Barril TIM α/β quinase		Piruvato quinase
Grupo VI: GHMP quinase		Galactoquinase
Grupo VII: AIR sintetase- <i>like</i>		Tiamina-fosfato quinase
Grupo VIII: Riboflavina quinase		Riboflavina quinase
Grupo IX: Dihidroxiacetona quinase		Glicerona quinase
Grupo X: Putative glycerato quinase		Glicerato quinase
Grupo XI: Polifosfato quinase		Polifosfato quinase
Grupo XII: Quinases integrais de membrana	a. Dolicol quinase	Dolicol quinase
	b. Undecaprenol quinase	Undecaprenol quinase

FONTE: Adaptado de Cheek 2005 ¹²

A família de proteínas quinases (PK) é a maior representante de proteínas de sinalização em organismos eucariotos complexos. Essa família inclui quinases capazes de fosforilar resíduos de tirosina, de serina e treonina ou de tirosina e treonina. Já em organismos procariotos e eucariotos simples, a família histidina-quinase (HK), que envolve a formação de um resíduo fosfo-histidina de alta energia, é predominante na via de transdução de sinal ¹¹. Embora a existência de fosfo-histidina como intermediário em reações enzimáticas também tenha sido descrita para organismos superiores, frequentemente a fosforilação e desfosforilação do resíduo de histidina eram consideradas de menor importância na sinalização regulatória ¹³. Entretanto, o desenvolvimento de técnicas para enriquecimento e a recente produção de anticorpos de fosfohistidina têm alterado esse cenário e, consequentemente, pesquisas para compreensão do papel de fosfohistidina na sinalização regulatória de organismos superiores se encontra na fronteira do conhecimento.

Uma recente análise do genoma humano confirmou a capacidade de codificar 538 proteínas quinases, dos 25 mil genes codificantes do genoma humano 2% codificam proteínas quinases. Essas proteínas quinases mediam a maior parte do sinal de transdução em células eucariotas via modificação do seu substrato. Além disso, essas proteínas controlam muitos processos celulares incluindo metabolismo, transcrição, progressão do ciclo celular, rearranjo do citoesqueleto e movimento da célula, apoptose e diferenciação. Sendo assim, essas proteínas apresentam um papel crítico na comunicação intercelular durante o desenvolvimento, na resposta fisiológica, na homeostase e no funcionamento do sistema nervoso e imunológico ^{10,14}. Por estas razões, as proteínas quinases ocupam um lugar de destaque como alvos terapêuticos para o tratamento de diversas doenças humanas ¹⁵⁻¹⁸.

Desde a aprovação do fasudil em 1995, sirolimus em 1999 e Imatinib (Gleevec®, Novartis) em 2001, o número de inibidores de quinases descrito como potenciais medidas terapêuticas tem aumentado ascendentemente ¹⁵. No período de 2001 a 2015, 25 novas pequenas moléculas inibidoras de quinase (SMKIs – do inglês, *small-molecule kinase inhibitors*), representadas na Figura 1, e 4 anticorpos monoclonais foram aprovados como medicamentos pela agência americana FDA (*US Food and Drug Administration*) ^{15,16,19,20}, e um grande número de inibidores dessa classe de proteína se encontram em diferentes fases de testes clínicos ²⁰.

Figura 1. Pequenas moléculas inibidores de quinase, SMKI, aprovadas pelo FDA para tratamento clínico. Das fármacos aprovados, 96% são destinadas a terapia anticancerígena e o Tofacitinib em destaque foi aprovado para o tratamento de artrite reumatoide.

FONTE: Adaptado de Raskandersen et al. (2013)²⁰

Em suma, a maior parte de inibidores de quinases aprovada pelo FDA, para aplicações clínicas são inibidores competitivos de ATP¹⁵, dentre os quais a maior parte é destinada a terapia anticancerígena, tornando as quinases os maiores alvos terapêuticos para esse tipo de tratamento, e em especial as tirosinas quinases²¹. A grande concentração das pesquisas em torno de inibidores de quinases para tratamentos de câncer está relacionada ao papel dessas enzimas na sinalização celular e o envolvimento crucial na biologia do câncer. Além disso, o interesse econômico da indústria biofarmacêutica e programas de aceleração (*Accelerated approval*) e inovação (*Orphan Drug Act*) aprovados pelo FDA estimulam a busca por moléculas inibidoras de quinases a serem aplicadas no tratamento do câncer^{21,22}.

Apesar de pouco expressiva, a participação das proteínas quinases em diferentes processos biológicos complexos, controlando um conjunto diverso de atividades celulares e extracelulares em organismos eucariotos e procariotos, tornam essas proteínas metas atraentes para o tratamento de uma série de doenças, muito além do câncer. Embora pouco expressivos, inibidores de quinases já têm sido aprovados para tratamentos de outras doenças como artrite reumatoide e fibrose pulmonar idiopática²³.

2.2.1. Nucleosídeo difosfato quinase humana – Alvo 1

A enzima nucleosídeo difosfato quinase (NDPK; EC 2.7.4.6, ou NDK) foi inicialmente descrita por catalisar a transferência de γ -fosforil de um nucleosídeo trifosfato (NTP), tais como ATP e GTP, para um nucleosídeo difosfato (NDP), incluindo ribo- e/ou desoxirribo-GDP, ADP, UDP e CDP. A catálise enzimática ocorre através de um mecanismo ping-pong via formação de um intermediário estável, em que o resíduo de histidina conservado no sítio ativo da enzima é fosforilado transientemente, como representado na Figura 2 a seguir ²⁴.

Figura 2. Esquema representativo do mecanismo ping-pong em que a enzima NDPK transfere o grupo γ -fosforil do nucleosídeo trifosfato ATP, para o nucleosídeo difosfato GDP, via a formação de um intermediário fosforilado estável representado por E*.

FONTE: Lima 2018

Na década de 1990, os baixos níveis de expressão do gene NM23 foram observados em células de câncer metastático, o que evidenciou a atuação deste gene como o primeiro supressor de metástase, MSG (do inglês, *metastasis suppressor genes*), denominado também NME (não metastático). Este gene NM23 ou NME, entretanto, revelou-se idêntico ao gene da NDPK-A, que passou a ser denominado também NME1 ou NM23-H1 ^{25,26}.

O efeito dos níveis de NTP/dNTP, resultantes da atividade de fosfotransferase da NME em níveis baixos, no processo de metástase não foi compreendido de imediato. Posteriormente, estudos reportados por Wagner et al. (1995) demonstraram que a enzima NDPK apresenta atividade de histidina quinase ²⁷, o que poderia portanto, ser um plausível mecanismo para compreender a correlação da NME com o processo de metástase. Porém, apenas recentemente, com o desenvolvimento de técnicas para análise de fosfohistidina, a NME tem ocupado uma posição de destaque como proteína chave para compreender como as modificações pós traducionais fosfohistidinas que afetam a sinalização em organismos eucariotos complexos ^{13,28}.

Em humanos a família de genes NME consiste de 10 membros (NME1 a NME10), que podem ser subdivididos em dois grupos. Grupo I abrange as proteínas NME1 a NME4, as quais apresentam atividade de fosfotransferência, NDPK. O Grupo II, inclui genes que codificam proteínas com identidade de 22 a 44%, essas proteínas, e com exceção da NME6, as proteínas desse grupo não apresentam atividade de fosfotransferase, devido ao domínio NDPK ser truncado ou estar associado a domínios extras ^{24,29}.

No grupo 1, as isoformas NME1 e NME2 são as mais investigadas, as estruturas primárias dessas isoformas compartilham 88% de identidade. Essas enzimas quinases são pertencentes ao Grupo III das ferredoxina-*like*, como descrito por Cheek et. al (2005)¹² e exposto anteriormente na Tabela 2. O enovelamento ferredoxina-*like* é caracterizado pelo enovelamento sanduíche $\alpha + \beta$, com a topologia $\beta\alpha\beta\alpha$ ¹¹ como ilustrado na Figura 3A.

Além desse enovelamento ocorre a presença de elementos estruturais próprios como um *loop* denominado alça *Kpn*, uma extensão C-terminal e uma região referida como cabeça (ou “head”) que engloba as hélices αA e $\alpha 2$ formando a fenda de ligação dos nucleotídeos, como representados na Figura 3B. A forma ativa dessas enzimas é um hexâmero que consiste de um trímero de dímeros (Figura 3C), onde a alça *Kpn* é

responsável por maior parte das interações intermoleculares que estabiliza o trímero (Figura 3D), além de conter três dos resíduos que interage com o substrato.

A região C-terminal forma uma estrutura estendida e esta envolvida nas interações dentro do dímero e entre as subunidades no trímero (Figura 3 E e F). A região contendo $\alpha 1$ e $\beta 2$ forma a maior parte da interface dimérica, enquanto as regiões contendo a $\alpha 0$ e a volta entre $\alpha 1$ e $\beta 2$ formam as interações do trímero. No hexâmero o sítio ativo é composto pela a alça *Kpn*, o resíduo de histidina nucleofílica conservado e o sítio de ligação dos nucleotídeos (região “*heat*”), um sítio único de ligação que aceita dois tipos de substratos, o NTP e o NDP³⁰.

Figura 3. Diagrama em *cartoon* da enzima NME2 (PDB: 1NUE)³¹. A) Representação do monômero indicando os elementos da estrutura secundária com o enovelamento ferredoxina-like destacado. Representação de três regiões destacadas indicando os motivos secundários estruturais e funcionais: alça *Kpn* em laranja, região da cabeça (“*heat*”) em verde e a extensão C-terminal em roxo B) no monômero e C) no hexâmero. D) e E) Duas vistas ortogonais de uma representação superficial do hexâmero com os motivos estruturais e funcionais também em destaque. O sítio de ligação dos nucleotídeos é composto pela região denominada “*heat*” em verde e o loop *Kpn* em laranja. As interações intermoleculares que formam o trímero envolve os resíduos dessas duas regiões.

FONTE: Lima 2018

Apesar das similaridades estruturais das isoformas NME1 e NME2 há uma divergência das propriedades catalíticas dessas enzimas. A proteína NM23-H1 atua como um supressor de metástase, enquanto a atividade histidina quinase tem sido majoritariamente observada para a isoforma NME2. Dentre os substratos para atividade de fosfohistidina destacam-se o canais TRP de condução Ca^{2+} , o TRPV5, o canal kCa3.1 , a subunidade β da proteína G heterotriméricas ($\text{G}\beta$) e a proteína anexina I ^{32–35}. Em cada um desses substratos, a fosforilação de um resíduo de histidina específico, pela ação da NME2, regula a transdução do sinal celular ou a atividade do canal.

NME2 é claramente uma proteína multifuncional distribuída no citoplasma, na membrana plasmática e no núcleo, onde a NME2 tem sido descrita recentemente por atuar como fator de transcrição do oncogene c-myc ³⁶, corroborando com investigações *in vitro* e *in vivo*, e estudos clínicos que têm demonstrado alta expressão da proteína NME2 em alguns tipos de cânceres incluindo hepatocarcinoma, melanoma, mama, cólon, pâncreas, pulmão, entre outros ^{37–39}.

Estudos realizados por Hamby et al. (2000) constataram que a superexpressão da enzima NME2 mutante H118Y, cataliticamente inativa, reduziu significativamente a metástase em cultura de células de melanoma humana, sustentando a hipótese de que a NME2 está envolvida na cascata de etapas da metástase ³⁸.

Posteriormente, estudos *in vitro* realizados por Rumjahn et al. (2010) e Yokdang et al. (2009) mostraram que NM23 são excretadas por células metastáticas de câncer de mama e atuam como transfosforilase, promovendo a migração celular endotelial, proliferação e formação de túbulos ^{40,41}. Ademais, Yokdang et al. (2015) demonstraram que a inibição da atividade da proteína NME2 extracelular e/ou do seu alvo endotelial (receptor purinérgico P2Y), promove uma diminuição do crescimento e da metástase em câncer de mama ⁴².

NME2 também tem sido extensivamente relacionada a carcinomas hepatocelular (HCC). Lee et al. (2011) demonstraram que a superexpressão dessa proteína foi 75% maior em tecidos de HCC, o que também foi observado em linhagem celular de hepatocarcinoma humano ³⁹.

Recentemente, outros estudos envolvendo a enzima NME2 foram realizados por Bouvard et al. (2017), onde demonstraram que a inibição da NME2, por stauprimida, promoveu uma regulação negativa (*down-regulation*) na transcrição do

gene MYC o que, conseqüentemente, inibiu a proliferação celular *in vitro* e interrompeu o crescimento tumoral de câncer renal em modelo animal⁴³.

Apesar dos esforços para compreender as funções biológicas das proteínas NME, a capacidade da enzima NME2 em regular a tumorigênese ainda é controversa, pois outros estudos envolvendo esta enzima a correlacionam com a supressão de metástase, como observado para o câncer de pulmão, gástrico, sarcoma e tumor de células gigantes ^{44,45}. No entanto, as evidências experimentais e clínicas do envolvimento da NME2 na biologia do câncer, como as supracitadas, sustentam a hipótese de que esta proteína é capaz de promover e modular a tumorigênese em diferentes ambientes celulares e tem apontado a NME2 como potencial alvo para intervenções terapêuticas e, para o controle de metástase ^{46,47}.

2.2.2. NDPK de *Leishmania major* – Alvo 2

Os parasitas protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes causadores da leishmaniose, que apresenta um amplo espectro de doenças clínicas, incluindo as formas tegumentar – LT (cutânea ou Úlcera-de-Bauru e mucocutâneas) e visceral (ou calazar), que se não tratada pode ser letal. As diferentes manifestações clínicas da leishmaniose dependem de fatores genéticos, ambientais, das características de virulência das diversas espécies de *Leishmania* e da resposta do sistema imune do hospedeiro. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO – *World Health Organization*) a leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, considerada um problema de saúde pública, que afeta principalmente os países em desenvolvimento como ocorre no subcontinente indiano, na América Latina e no Leste da África ⁴⁸. Somente no Brasil, 17 mil novos casos de LV e mais de 1.100 óbitos foram registrados no período de 2010 a 2014, o que representa a urgente necessidade de medidas para a erradicação da doença no país ⁴⁹.

Atualmente os medicamentos disponíveis para o tratamento das diversas manifestações clínicas de leishmaniose apresentam altos efeitos colaterais, exigem longo período de tratamento e, em muitos casos, são ineficazes devido ao surgimento de cepas resistentes, como pode ser observado na Tabela 3. Tendo em vista o sucesso de enzimas como alvo terapêutico, a identificação de moléculas relevantes

para a sobrevivência da *Leishmania* e/ou a morte das células hospedeiras é de potencial interesse para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Tabela 3. Drogas disponíveis para o tratamento de leishmaniose

Droga	Tempo de tratamento	Eficácia em pacientes	Resistência	Efeitos Colaterais
Antimônio pentavalentes (Sb(V))	28 a 30 dias	35-95% (dependendo da área)	Comum (> 65%)	Cardiotoxicidade severa, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade
Anfotericina B	15 a 20 dias, diariamente ou alternando	>90%	Cepas em laboratório	Nefrotoxicidade grave, reações relacionadas à infusão, hipocalemia, febre alta
Lipossoma anfotericina B	Dose única	>97%	ND*	Rigores e calafrios leves durante a infusão, nefrotoxicidade leve
Miltefosina	28 dias	Índia: 94% África: 60% a 93%	Cepas em laboratório	Vômitos e diarreia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade
Paromomicina	17 a 21 dias	Índia: 94% África: 46 a 85%	Cepas em laboratório	Nefrotoxicidade grave, hepatotoxicidade
Pentamidina	4 injeções	35 a 96 % (dependendo da <i>Leishmania spp.</i>)	ND*	Alta taxa de hiperglicemia, devido ao dano pancreático; hipotensão taquicardia e alterações eletrocardiográficas

FONTE: Adaptado de Menezes et al. (2015) ⁵⁰; * ND – Não determinado

Os estágios promastigota e amastigota alternam no ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania*, e se desenvolvem no interior do intestino do mosquito flebotômíneo (vetor) e dentro dos macrófagos de mamíferos (cão ou homem), respectivamente ^{48,51}. *Leishmania spp.*, portanto, supera as alterações fisiológicas drásticas à medida que transaciona do estágio promastigota extracelular, no ambiente neutro dentro do mosquito, para o estágio amastigota intracelular que residem no interior dos vacúolos parasitóforos ácidos de macrófagos a 37°C ^{52,53}. Esse intenso processo de adaptação observado para a *Leishmania* é amparado por uma série de estratégias ainda pouco elucidadas⁵⁴, que incluem as próprias mudanças morfológicas do ciclo celular e a secreção de moléculas específicas na superfície da célula do parasita e no meio extracelular ^{53,55}.

Diversos microrganismos patogênicos, assim como a *Leishmania spp.*, liberam enzimas capazes de controlar os níveis de NTPs, e em particular interesse a quantidade de ATP extracelular (eATP), uma vez que o acúmulo deste nucleosídeo trifosfato sinaliza, através dos receptores purinérgicos P2X, para que as células imunológicas entrem em ação ⁵⁶. Dentre as diversas enzimas disponíveis para redução do eATP, a enzima NDPKb (ou NDPKb) tem sido descrita para uma série de organismos como *M. tuberculosis* ⁵⁷, *P. gingivalis* ⁵⁸, *Pseudomonas aeruginosa* ⁵⁹, *T. spiralis* ⁶⁰, *V. cholerae* ⁶¹ e *Leishmania amazonenses* ^{62,63}. Para a *L. amazonenses* estudos realizados por Kolli et al. (2008) comprovaram que a enzima NDPKb preveniu a morte de macrófagos induzida por ATP, preservando a integridade das células do hospedeiro em benefício do parasita, comportamento que foi observado na fase promastigota inicial, bem como na fase amastigota crônica ⁶². Aparentemente, a liberação de NDPKb no meio extracelular pela *Leishmania* e os outros organismos é uma das vias de controle da concentração de eATP e tem importância funcional crucial para o sucesso da infecção dos macrófagos.

As complexas interações que ocorrem entre parasita-hospedeiro-vetor ainda não foram totalmente elucidadas. Nesse contexto, o avanço tecnológico e as ciências ômicas, incluindo genômica e transcriptoma, têm contribuído para uma melhor compreensão dessas interações, fornecendo importantes diretrizes para intervenções terapêuticas ^{64,65}. Corroborando com os dados de excreção da NDPKb em *L. amazonensis*, análises de transcriptoma revelaram que o gene codificante da proteína NDPKb foi positivamente-regulado em células amastigotas da espécie *L. infantum* ⁵⁵ evidenciando a que uma superexpressão dessa enzima nessa fase do ciclo é de extrema importância para a sobrevivência do parasito. Ademais, análises de fosfoproteômica e investigação realizada por Moreira et al. (2016), demonstraram que a proteína NDPKb permanece com o resíduo de histidina do sítio ativo fosforilado, sendo também mais expressa em linhagens de *L. braziliensis* e *L. infantum* resistentes a Sb(V), o principal tratamento para a doença de leishmaniose ^{66,67}. Além disso, os autores também verificaram que a superexpressão da NDPKb em cepas de *L. braziliensis* as tornam menos susceptíveis ao tratamento com Sb(V) ⁶⁷. Nesse âmbito, a inibição da enzima a NDPKb de *Leishmania spp.* é um potencial alvo terapêutico para o desenvolvimento de leishmanicidas. Nesse contexto, estudos virtuais

(*molecular docking*) recentemente já foram descritos para acelerar a identificação de moléculas capazes de modular a atividade da enzima NDPKb de *Leishmania spp.* ^{68,69}.

Assim como a NME2, a NDPKb de *L. major* (ou *LmNDPKb*) apresenta uma estrutura com o enovelamento ferredoxina-like com seis α -hélices cobrindo parcialmente uma folha β antiparalela de quatro cadeias e os elementos estruturais alça *Kpn*, a região nomeada cabeça (“*heat*”) e uma extensão C-terminal, como supracitados para a enzima NME2 ^{70,71} (Figura 4A).

Figura 4. Estrutura quaternária em *cartoon* da enzima NDPKb de *L. major* (PDB: 3NGU) ⁷⁰. Representação da estrutura secundária com três regiões destacadas indicando os motivos secundários estruturais e funcionais: alça *Kpn* em laranja, região da cabeça (“*heat*”) em verde e a extensão C-terminal em roxo A) no monômero, onde está indicado todos os elementos da estrutura secundária, B) no hexâmero C) e D) Duas vistas ortogonais de uma representação superficial do hexâmero com os motivos estruturais e funcionais também em destaque. O sítio de ligação dos nucleotídeos é composto pela região denominada “*heat*” em verde e a alça *Kpn* em laranja. As interações intermoleculares que formam o trímero envolve os resíduos dessas duas regiões.

FONTE: Lima 2018

A *LmNDPKb* possui uma identidade de 73% com a humana NME2, e também apresenta a forma de hexâmero em solução, como ilustrado na Figura 4B. A interface trimérica também envolve principalmente os resíduos da alça *Kpn* e da extensão C-terminal, como ilustrado na Figura 4C e D, além disso as estruturas secundárias $\alpha 1$, $\beta 3$, $\alpha 3$ e $\alpha 0$ também são importantes para a manutenção das interações intermoleculares de formação do trímero. A fenda catalítica é composta pela alça *Kpn* juntamente com a região “*heat*”, essa região apresenta como característica uma superfície com carga positiva que é importante para a ligação dos substratos, que por sua vez, apresentam carga negativa em suas estruturas. Por esta razão, essas são regiões altamente conservadas e que tem apresentado ser essencial para manutenção da atividade da enzima *LmNDPKb*.

2.3. Inibidores enzimáticos para a NDPK

A descrição de inibidores para as enzimas alvo *LmNDPKb* e NME2 ainda é reduzida, sendo restrita a nucleotídeos incapazes de doar fosfato como ocorre para o 3’5’-adenosina-monofosfato-cíclico (cAMP) e análogos ⁷²⁻⁷⁴ e alguns poucos compostos como Ebselen ⁷⁵ e alguns polifenóis como a Epigallocatequina-3-galato (EGCG), a (-)-Epicatequina galato (ECG) e o ácido elágico (EA) ^{76,77}.

O efeito de inibição do cAMP sobre a atividade de fosfotransferase da enzima NDPK de eritrócitos foi inicialmente demonstrado por Mourad & Parks. Em seguida MacDonald et al. (1995) comprovaram a inibição do cAMP frente a fosforilação de serina da enzima NM23 ⁷³. Posteriormente, Strelkov et al. (1995) evidenciaram que o cAMP age como um inibidor do tipo competitivo ao substrato ATP para a enzima homóloga de *Myxococcus xanthus* ⁷⁸ e Anciaux et al. (1997) evidenciaram que a atividade de fosfotransferase da enzima NM23 também poderia ser inibida quando na presença de análogos de cAMP, os quais poderiam ser utilizados como agentes anticancerígenos ⁷².

Valenti et al. (1999) demonstraram que o composto zidovudina, ou AZT, que é um análogo de nucleotídeo utilizado como fármaco para o tratamento da AIDS, atua como inibidor da atividade da enzima NDPK de mitocôndria de ratos, com um valor de constante de inibição (K_i) de 10 μ M. O mecanismo de ação competitivo foi determinado para o AZT, quando na presença de diferentes substratos aceptores de fosfato (UTP,

UDP, CDP e GDP). Os autores evidenciaram ainda que a inibição por excesso do substrato GDP, mascara a inibição do AZT⁷⁹. O que demonstra, portanto, como a identificação e caracterização de inibidores para enzimas NDPK é um desafio, o que justifica os poucos inibidores descritos na literatura.

A capacidade dos polifenóis EGCG, ECG e ácido elágico (EA) em inibir a atividade de fosfotransferase da enzima NME2 foi descrita, pela primeira vez, por Malmquist et al. (2001) em estudos preliminares. Nestes estudos os autores purificaram parcialmente a NME2 excretada a partir de células de câncer de mama, e utilizando ensaios enzimáticos indiretos por bioluminescência determinaram os valores da capacidade inibitória (IC₅₀) e mecanismo de ação, sendo o EA o mais potente inibidor encontrado ^{76,77}. Posteriormente, Yokdangan et al. (2015) demonstraram a diminuição do desenvolvimento do câncer de próstata e supressão metastática em modelo animal, através da inibição da atividade da enzima NME2 na presença de EA, ou da combinação de EA com um antagonista de receptor purinérgico (MRS2179) ⁴², demonstrando assim, a relevância de inibidores de NME2 como agentes anticancerígenos.

Semianrio-Vidal et al. (2010) também descreveram o Ebselen como potente inibidor de NME2 extracelular, com mecanismo de ação do tipo não competitivo, similar ao observado por Malmquist para os compostos EA, EGCG e ECG ⁷⁵.

Recentemente, Mishra et al. (2017) utilizaram triagem virtual para identificação de inibidores da enzima NDPKb de *L. amazonensis*. Os estudos de inibição resultaram na identificação de um inibidor efetivo, o BTB13319, que utilizando o ensaio acoplado com a enzima piruvato/desidrogenase inibiu 80% da atividade de fosfotransferase a uma concentração de 3,15 µM. O BTB13319 também inibiu 45% da proliferação de promastigotas de *L. dovani* a uma concentração de 100 µM ⁸⁰.

A escassez de inibidores diante da potencialidade das enzimas NME2 e *LmNDPKb* como alvos terapêuticos pode ser devido a dois fatores, a complexidade que a inibição por excesso de substrato causa ao mascarar os resultados de inibição, como observado por Valenti et al. (1999) ⁷⁹, ou ainda devido aos laboriosos ensaios disponíveis para mensurar a atividade dessas enzimas.

2.4. Métodos para quantificar a atividade da enzima NDPK

Uma ampla variedade de métodos para a quantificação da reação de enzimas quinases têm sido descritos, e diferentes técnicas podem ser mais adequadas para um tipo específico de quinase. Para a enzima NDPK, destacam-se os ensaios indiretos envolvendo reações acopladas e os ensaios para quantificação direta da atividade que utilizam substratos radioativos ou abordagens analíticas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*).

O ensaio acoplado com as enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase é o mais difundido. Neste ensaio a atividade é mensurada de forma indireta, onde a hidrólise do NTP é acompanhada pela oxidação do NADH ^{74,81}. Contudo, esse sistema é compatível apenas com o acceptor de fosfato TDP, pois qualquer outro NDP atua como substrato para a enzima piruvato quinase e promove o início da reação de acoplamento ⁸².

Outro sistema acoplado que apresenta alta sensibilidade para mensurar a depleção de ATP envolvido na reação de interesse, é o ensaio bioluminescente utilizando a enzima luciferase ^{76,83}. Nesse sistema a luciferase catalisa a oxidação da D-luciferina na presença de ATP, oxigênio e Mg^{2+} , produzindo um produto fluorescente que pode ser quantificado medindo a luz liberada.

Uma alternativa aos métodos indiretos, é o uso de nucleotídeos radio marcados, como por exemplo o γ -³²P-ATP ou γ -³³P-ATP, associados a cromatografia de camada fina, TLC (do inglês *thin-layer chromatography*) ⁸⁴⁻⁸⁷, que proporciona uma detecção direta da atividade enzimática da NDPK. No entanto, apesar da alta sensibilidade dos ensaios radiométricos, a eliminação de resíduos radioativos e as considerações de segurança tornam esta abordagem cada vez mais impopular.

A detecção de formação do produto é o mais desejável para mensurar a atividade enzimática. Nesse âmbito, Lambeth e Muhonen (1993) propuseram ensaios utilizando HPLC para quantificar a atividade da NDPK através do monitoramento direto e simultâneo dos produtos e substratos envolvidos na reação ⁸⁸. Ademais o método permite a realização de ensaios com diferentes tipos de substratos aceptores e doadores de fosfato ^{24,82}. Em suma, todos os métodos supracitados podem ser

utilizados para mensurar a atividade das enzimas NDPKs e exibem vantagens e desvantagens intrínsecas.

2.5. Enzimas Imobilizadas

A imobilização é um processo em que as enzimas são fixadas a suportes sólidos, criando um sistema heterogêneo de enzimas imobilizadas, ou biorreatores ⁸⁹. Efetivas, as técnicas de imobilização apresentam vantagens, sobre a utilização de enzimas livres em solução, dentre as quais prevalecem o aumento do tempo de vida e da estabilidade da enzima frente a fatores desnaturantes como temperatura, solventes orgânicos e à variação de pH, além da facilidade de separação da enzima dos produtos da reação ⁸⁹⁻⁹². Por estas razões, a aplicação de enzimas imobilizadas em diversos segmentos industriais como na produção de alimentos e bebidas ⁹³, clareamento de papel, caracterização de detergentes ⁹⁴, produção de biocombustível ⁹⁵ e em outros setores é bem consolidada.

Os avanços em engenharia genética e o início da era “ômica” expandiram o uso de enzimas imobilizadas para outras áreas do conhecimento. Enzimas imobilizadas tem sido utilizada com sucesso para a digestão de proteína em estudos de proteômica ⁹⁶, bem como na área médica para diagnósticos de doenças e produção de novos fármacos⁹⁷.

A ampla aplicação de enzimas imobilizadas, tanto no setor industrial quanto na pesquisa, impulsionou o desenvolvimento de inúmeras metodologias de imobilização, bem como uma diversidade de materiais para suportes.

Os métodos de imobilização mais difundidos estão ilustrados na Figura 5, e podem ser classificados em dois grandes grupos, reversível e irreversível. Imobilizações reversíveis possibilitam, como o próprio nome sugere, a remoção da enzima do suporte por simples reação reversa ou alterações das condições pelas quais a imobilização foi realizada. Dentre esses métodos destacam-se a adsorção física e iônica, ligação dissulfeto, imobilização por afinidade e mais especificamente por formação de quelatos^{89,98-100}. Este último baseia-se na capacidade de aminoácidos carregados e polares, como histidina, lisina, fenilalanina, cisteína e tirosina, se ligarem a íons metálicos por meio de ligações coordenadas, e assim como os outros métodos reversíveis, essa estratégia possibilita a regeneração do suporte, porém, devido a intensidade da ligação coordenada esta abordagem reduz o

desligamento de enzima do suporte, um efeito comum observado para os demais métodos reversíveis de imobilização ^{100,101}.

Figura 5. Esquema representativo das metodologias reversíveis e irreversíveis mais frequentemente utilizadas para a imobilização de enzimas. A) Adsorção física; B) Adsorção iônica; C) Ponte dissulfeto; D) Quelação com metal; E) Ligação cruzada usando CLEAs (E1) e CLEC (E2); F) Encapsulamento; G) Aprisionamento em matriz e H) Imobilização por ligação covalente.

FONTE: Lima 2018

A imobilização irreversível envolve ligações químicas fortes e, em geral, mantém a estabilidade das enzimas durante um longo período de tempo ^{91,92}. Essa abordagem pode ser realizada por meio de ligação cruzada usando enzimas cristalinas (CLEC - *cross-linked enzymes crystals*) ou por formação de agregados físicos (CLEAs - *cross-linked enzyme aggregates*), aprisionamento, encapsulação e ligação covalente ^{91,92,102}, sendo esta última um dos métodos mais disseminados. Nessa metodologia, a enzima é imobilizada via formação de uma ligação covalente entre o suporte e os grupos funcionais presentes nas cadeias laterais dos

aminoácidos, mais comumente a lisina (grupo ϵ -amino), histidina (grupo imidazol), cisteína (grupo tiol), ácido aspártico e ácido glutâmico (grupo carboxílico)¹⁰⁰. Uma ampla variação de reações químicas estão disponíveis para imobilização covalente, onde diferentes grupos funcionais na enzima no suporte são explorados⁸⁹. Ademais modificações químicas para produção de suportes heterofuncionais, ou uso de agentes espaçadores entre o suporte e a enzima também tem sido empregados para a imobilização covalente de enzimas^{103,104}.

Outro aspecto importante a ser considerado é a seleção do suporte para a imobilização da enzima que dependerá, sobretudo, da configuração final do sistema em que o biorreator será utilizado. Nesse âmbito, fatores como propriedades mecânicas, porosidade, morfologia e disponibilidade de grupos reativos são preponderantes¹⁰⁵. Suportes de materiais de carbono, ou a base de materiais minerais como sílica, óxidos inorgânicos ou vidros porosos são opções excelentes para sistemas que irão suportar altas pressões, em contrapartida, esses suportes são escolhas inadequadas para biorreatores que serão submetidos a processos de agitação¹⁰⁵. De maneira geral, o material do suporte também deve apresentar poucas interações não específicas com os componentes da amostra, mas ao mesmo tempo ser passível de modificações para realizações de ativações químicas e posterior retenção da macromolécula^{105,106}. Em síntese, uma variedade de suportes está disponível comercialmente, e a escolha deste bem como da metodologia para retenção da enzima alvo devem ser compatíveis com a aplicação final da enzima imobilizada.

Um das aplicações de enzimas imobilizadas é sua utilização como coluna de bioafinidade em sistemas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seja para a identificação e caracterização de inibidores enzimáticos^{107–112}, bem como para a digestão de proteínas^{113–115}. Nesse contexto, frequentemente utiliza-se a imobilização covalente, que pode ser realizada por diferentes reações químicas, como a base de Schiff, de epóxido e de formação de ligações amidas, as quais ocorrem através dos grupos funcionais amino, epóxi e carbóxilo, respectivamente¹¹⁶. Além disso, em menor proporção utiliza-se também a imobilização por afinidade que pode envolver a formação de quelatos ou a ligação entre a biomolécula de interesse e um ligante secundário no suporte¹¹⁷.

Os métodos de imobilização, seja covalente ou por afinidade, apresentam aspectos positivos e negativos. A imobilização covalente, comumente é multipontual, estabiliza as enzimas por um longo período de tempo e evita o desligamento do suporte frente ao fluxo dos sistemas cromatográficos, porém essa estabilização pode ser demasiada grande e enrijecer a estrutura terciária, o que pode afetar a atividade da enzima imobilizada¹¹⁸. A imobilização por afinidade, por sua vez, apresenta como vantagens a possibilidade de regeneração do suporte e também favorece uma maior mobilidade da enzima, o que permite a ocorrência de mudanças conformacionais necessárias para manutenção da atividade enzimática¹¹⁹. Entretanto, a retenção da biomolécula por um processo reversível quando associada a sistemas cromatográficos em fluxo ocasiona o desligamento da proteína e, conseqüentemente, um sistema de baixa reprodutibilidade.

Já em relação ao suporte para imobilização de enzimas a ser utilizado em sistemas cromatográficos é importante que este permita a acessibilidade dos substratos ao sítio ativo da proteína, além de ser inerte, estável e de alta resistência mecânica. Há uma variedade de opções disponíveis comercialmente que são compatíveis com sistemas cromatográficos que apresentam alta pressão e análises em fluxo, como é o caso de materiais a base de sílica derivatizada e monolitos¹¹⁷. Outras propriedades físicas, como porosidade, distribuição do tamanho dos poros e carga também são importantes, pois influenciam o processo cinético¹²⁰. Em suma, a escolha do método de imobilização e do suporte adequados permite reter a atividade da macromolécula de interesse na coluna de bioafinidade e até mesmo sua mobilidade conformacional¹²¹, que permite estudar as interações alostéricas¹²².

2.6. Enzimas imobilizadas para a triagem e caracterização de inibidores

Enzimas imobilizadas em suportes apropriados, geram colunas de bioafinidade também denominadas IMER (do inglês, *immobilized enzyme reactors*), que podem ser utilizadas em HPLC com detecção por absorvância¹²³, fluorescência¹²⁴ ou hifenado as técnicas de espectrometria de massas (MS)^{109,125} e/ou ressonância nuclear magnética de alta resolução (RMN-AR). Sistemas desse tipo apresentam alta reprodutibilidade, sensibilidade de detecção e possibilidade de automação para realização de triagem de ligantes em bibliotecas ou misturas complexas¹¹⁶. Nesse

âmbito, o uso desta técnica surge como uma promissora alternativa aos ensaios de HTS convencionais.

As colunas de bioafinidade em sistemas cromatográficos são aplicadas para a triagem e identificação de inibidores enzimáticos^{109,123–125}, bem como para estudar diferentes tipos de interações como proteína-proteína^{126–128}, ligante-receptor^{129,130} ou inibidor-proteína^{110,127,131}, o que pode ocorrer utilizando mais frequentemente os modos de eluição zonal (LZC, do inglês *linear zonal chromatography*) ou frontal (FAC, do inglês *frontal affinity chromatography*).

2.6.1. Cromatografia de eluição zonal

Na eluição zonal um pequeno volume da amostra contendo o soluto puro ou em uma mistura é injetado na coluna e um detector *on-line* monitora o tempo de eluição ou o volume do soluto, resultando em uma banda ou zona¹¹⁶. Nessa abordagem é possível obter a separação total dos componentes da amostra e o tempo de retenção, assim o perfil de eluição dos componentes da amostra podem ser utilizados para obter informações sobre a interação entre o analito e a fase estacionária¹³².

A cromatografia zonal empregando colunas de bioafinidade é denominada cromatografia zonal de bioafinidade (ZBC, do inglês *zonal bioaffinity chromatography*) e permite medir o grau e a afinidade da interação ligante-proteína. Nessa abordagem o fator de retenção (k) do soluto injetado pode ser utilizado como parâmetro para medir o quão forte um composto interage com a coluna de bioafinidade¹¹⁶. Assim, ao comparar o valor de k de diferentes compostos pode-se determinar a sua afinidade relativa pela enzima na fase estacionária da coluna¹³³. Além disso, a variação da composição da fase móvel - seja em termos de força iônica, pH, temperatura ou solvente -, fornece informações relevantes sobre as forças e mecanismos envolvidos na interação ligante-proteína¹¹¹.

Outros estudos que também são usualmente realizados por eluição zonal, são os estudos de competição e deslocamento, que permitem análise qualitativa e quantitativa das interações que ocorrem em um único sítio de ligação da proteína. Para este fim, o ligante conhecido é injetado no sistema enquanto uma concentração fixa de um agente competidor de teste é eluída através da coluna de bioafinidade. Utilizando essa abordagem de estudo, Matsuda et al. (2015) demonstraram com

sucesso a competição entre a glimepirida e a varfarina pelo sítio *Sudlow I* da enzima HSA (soro albumina humana) imobilizada em suportes de sílica¹³⁴.

Além disso, a triagem e caracterização de inibidores usando coluna de bioafinidade e eluição zonal pode ainda se basear no monitoramento da atividade enzimática. Nesse caso, a atividade da enzima na fase estacionária é monitorada pela injeção do substrato na ausência e presença dos candidatos a inibidores. Assim quando na presença de um inibidor observa-se uma redução da atividade enzimática¹³⁵. Essa abordagem tem apresentado resultados bem-sucedidos na caracterização cinética de inibidores de colinesterases, por exemplo^{109,112,123}. Nessa abordagem o IMER pode ser utilizado em sistemas *on-line*, em que pode ser diretamente conectado a um detector^{109,123–125}, ou ainda interligado como pré ou pós-coluna analítica. Em análises em que o IMER é utilizado como pós-coluna, os analitos da amostra são separados por uma coluna analítica antes serem introduzidas no IMER para o monitoramento da atividade¹³⁵. Já nos ensaios como pré-coluna, o IMER é acoplado usualmente a uma coluna de cromatografia líquida de fase reversa (RPLC), em uma segunda etapa, na qual ocorre a separação de substratos e produtos antes da detecção^{102,136–139}. Esta abordagem tem demonstrado ser eficiente para o monitoramento direto da atividade, identificação e caracterização de inibidores das enzimas alvos NTPDase^{136,137}, purina nucleosídeo fosforilase (PNP)^{139,140}, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*¹³⁸ e catepsina D¹⁴¹.

A eluição zonal oferece vantagens: (1) requer apenas uma pequena quantidade de soluto por injeção. (2) É também possível examinar mais do que um composto por injeção, desde que estas substâncias possam ser detectadas separadamente ou que seja obtida uma resolução adequada entre os respectivos picos correspondentes. (3) Ele usa equipamento LC padrão, mas em alguns casos, o controle de temperatura é necessário. (4) Detecta facilmente pequenas mudanças na retenção, de apenas alguns segundos.

2.6.2. Cromatografia frontal

Na análise frontal, a amostra é continuamente introduzida na coluna até completa saturação desta, para isso os analitos são adicionados à fase móvel não permitindo, portanto, a separação total dos componentes presentes em uma

mistura¹³². Os constituintes da amostra migram e saturam a coluna em diferentes velocidades, formando uma curva de saturação característica chamado *front*. Essa técnica é usualmente aplicada para estudar a retenção relativa baseada na afinidade do analito pela fase estacionária¹³⁵.

A cromatografia frontal é, portanto, uma abordagem que também pode ser utilizada para estudos de afinidade e quando aplicada a colunas de enzimas imobilizadas é definida como cromatografia de afinidade frontal (FAC) [107-111,136]. A curva de saturação ou *front* também é observado e pode ser utilizado para determinar constantes de equilíbrio, a cinética e números de sítios ativos que estão presentes na interação entre o ligante e a enzima imobilizada¹³³.

A FAC também pode ser utilizada para analisar como a mudança da fase móvel ou a temperatura afetam a afinidade e o número de sítios de ligação envolvidos na interação ligante-proteína. Alterações no sítio de ligação do D/L-triptofano à HSA em função do pH foi estudada com sucesso utilizando FAC, bem como estudos dos efeitos da temperatura em interações biológicas entre R/S-varfarina, D/L-triptofano com HSA¹⁴².

A FAC acoplada à espectrometria de massas (FAC-MS) é uma ferramenta valiosa para a triagem, identificação e caracterização de ligantes. Essa abordagem foi utilizada com êxito para identificar os ligantes potentes da enzima galectina 3 humana em uma coleção de 17 dissacarídeos. Outra aplicação bastante interessante da FAC-MS foi diferenciar a afinidade do receptor PPAR γ imobilizado na fase estacionária por dois enantiômeros em uma mistura racêmica¹⁴³. Nesse contexto estudos de deslocamento usando FAC-MS podem ser utilizados para caracterização de ligantes, essa abordagem foi eficientemente utilizada por Singh et al. (2013), por exemplo, que caracterizaram o sítio de ligação da quercetina da histona desacetilase (SIRT6) imobilizada em tubo capilar aberto de sílica¹¹⁰.

2.7. Características intrínsecas das enzimas e tratamento matemático

A catálise enzimática ocorre no sítio ativo, uma região específica da enzima que frequentemente se localiza no interior de cavidades e bolsões. Os resíduos de aminoácidos presentes no sítio contêm grupos químicos reativos, que são arranjados espacialmente para favorecer a catálise de transformação de moléculas de substrato

em produtos. Assim como a conformação estrutural 3D da proteína, os resíduos do sítio ativo não são rígidos e podem adotar mudanças quanto a orientação espacial, força e ângulo de ligação, e caráter eletrônico durante o curso da reação⁵.

A reação catalisada pelas enzimas assim como qualquer reação química é termodinamicamente favorável ou espontânea quando a variação da energia livre (ΔG) é negativa. A ΔG° no estado padrão de uma reação é dada por uma relação de dois termos: i) termo constante, cujo valor depende apenas da ocorrência da reação e leva em consideração a constante dos gases R e a temperatura T, ii) termo variável, que depende da concentração dos reagentes e dos produtos, da estequiometria da reação e temperatura, e é dado pela constante de equilíbrio da reação, K_{eq} :

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq} \quad (1.1)$$

Entretanto, ainda que ΔG° determine o sentido global da reação e seja favorável ($\Delta G^\circ < 0$), a velocidade com que a reação se processa depende da energia livre de ativação necessária para que a reação aconteça.

No contexto de reações catalisadas enzimaticamente, a enzima (E) catalisa a conversão do substrato S a um produto P através da formação de um complexo ES:

A formação desse complexo ES representa um equilíbrio termodinâmico e pode ser mensurável em termos da constante de equilíbrio, K_S , que é definida pela razão entre as concentrações de produto e substrato, ou pela razão das taxas de reação k_1 e k_{-1} , como demonstrado na equação 1.3.

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_1}{k_{-1}} \quad (1.3)$$

Os grupos químicos reativos do sítio ativo da proteína transformam o substrato a produto via formação de uma série de espécies intermediárias como representado na equação 1.4. A formação desses vários estados de transição ES, $ES^\ddagger$ e EP durante o curso da reação representam um equilíbrio micro reversível.

O progresso da reação após a formação do complexo ES, entretanto, é determinado em termos de k_{cat} , que representa a etapa limitante da reação:

Sendo k_{cat} uma constante de equilíbrio, ela pode ser expressa em termos de energia livre, na forma de:

$$\Delta G^\ddagger = -RT \ln k_{cat} \quad (1.6)$$

Contudo, mesmo que o processo seja favorável em termos da termodinâmica, o mesmo pode ocorrer com velocidades insignificantes.

A velocidade de uma reação enzimática, por sua vez, pode ser mensurada em termos de desaparecimento do substrato ou produção do produto em função do tempo. Como mencionado, a etapa limitante na catálise enzimática é a conversão do complexo ES a produto, portanto, a equação de velocidade pode ser dada por:

$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_{cat} [ES] \quad (1.7)$$

onde k_{cat} é a constante de velocidade para ultrapassar a energia de ativação.

A relação de k_{cat} e $\Delta G^\ddagger$ é dada pela equação 1.8, onde verificamos que a velocidade diminui quando a energia livre do complexo ES, $\Delta G^\ddagger$, aumenta. Dessa forma, as enzimas catalisam a diminuição da energia livre de ativação, através da diminuição da $\Delta G^\ddagger$ e, conseqüentemente, aumentam a velocidade da reação.

$$k_{cat} = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (1.8)$$

onde k_B é a constante de Boltzman e h a constante de Planck.

A diminuição de $\Delta G^\ddagger$, realizada pelas enzimas ocorre através da formação e estabilização do complexo enzima-substrato (ES). Existem diferentes estratégias pelas quais as enzimas são capazes de estabilizar esses estados de transição como aproximação, catálise covalente, catálise ácido/base ou distorção conformacional^{5,144}. Além dessas estratégias, o principal fator que favorece a estabilização dos estados de transição é a complementariedade entre o sítio ativo da enzima e a forma estrutural

destas espécies. Essa condição permite que as enzimas estabilizem mais os estados de transição do que as moléculas de substrato e produto, favorecendo assim a diminuição da energia de ativação e, conseqüentemente, a catalise enzimática.

A medição das taxas constantes para cada estado de transição pode ser obtida a partir de estudos cinéticos do estado transiente ou métodos biofísicos. Contudo, a taxa de reação que governa a reação é mais comumente determinada baseado em estudos cinéticos do estado estacionário.

2.8. Cinética do estado estacionário

A proposta do estado estacionário foi feita pela primeira vez por Briggs e Haldane em 1925 ¹⁴⁵. Nesse modelo assume-se uma fase transitória rápida inicial que logo chega a um equilíbrio estacionário em que o complexo ES permanece aproximadamente constante, uma vez que a concentração do substrato, S, está em excesso.

Nas condições de estado estacionário todos os termos da reação de velocidade são mensuráveis experimentalmente, e a dedução da equação de velocidade de uma reação enzimática simples, em que a enzima converte um substrato a um produto, é dada por:

$$v_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_M + [S]} \quad (1.9)$$

onde K_M é a constante de Michaelis-Menten, que pode ser definida em termos das constantes de equilíbrio da reação, como representado na equação a seguir:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \quad (1.10)$$

A equação de velocidade para o estado estacionário descreve uma hipérbole e K_M é a concentração de substrato na qual a velocidade da reação é a metade da velocidade máxima ($V_{M\acute{a}x}$).

2.8.1. Cinética do estado estacionário para o mecanismo ping-pong

Enzimas que catalisam reações multi-substratos estão envolvidas em 60% das reações biológicas, e dentre essas reações há um número significativo de reações enzimáticas envolvendo dois substratos, denominadas reações de bissubstrato ⁵.

Quinases, fosfatases, hidroxilases, acetilases e outras classes de enzimas catalisam reações de bissubstrato. Três diferentes tipos dessas reações são frequentemente observados, a primeira é a reação ordenada bi bi, em que o primeiro substrato se liga à enzima e promove mudanças conformacionais para que o segundo substrato se ligue. O segundo tipo é a reação aleatória bi bi, em que os sítios para ligação de ambos os substratos já estão prontos, em ambos os casos os dois substratos se combinam com a enzima antes da liberação do produto. O terceiro caso que ocorre fortuitamente, é o mecanismo ping-pong, no qual ocorre a ligação alternada dos substratos e liberação de um produto antes que o segundo substrato seja adicionado ^{5,146}.

A enzima NDPKb, objeto desse estudo, catalisa a fosfotransferência do grupo γ -fosfato de um NTP para um acceptor de fosfato, o NDP, através do mecanismo ping-pong, que pode ser descrito usando a notação de Cleland:

onde: E = enzima livre

EA = complexo enzima substrato A (NTP₁)

FP = complexo enzima-produto (NDP₁)

F = enzima fosforilada (Intermediário estável)

FB = complexo enzima fosforilada-substrato B (NDP₂)

EQ = complexo enzima-produto (NTP₂)

Nesse mecanismo após a liberação do primeiro produto (NDP₁) a enzima permanece na forma de um intermediário estável (F), correspondente a enzima fosforilada no resíduo de histidina (His) no sítio ativo da enzima. A seguir, o grupo

fosforil é transferido para o segundo substrato (NDP₂), formando assim o segundo produto (NTP₂).

A equação reduzida de velocidade inicial da reação enzimática para o mecanismo ping-pong no estado estacionário e na ausência de produtos é dada por:

$$\frac{v}{V_{Max}} = \frac{[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] + [A][B]} \quad (1.11)$$

A equação pode ser rearranjada para mostrar cada substrato como substrato variado:

$$\frac{v}{V_{Max}} = \frac{[A]}{K_{mA} + [A] \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right)} \quad (1.12)$$

$$\frac{v}{V_{Max}} = \frac{[B]}{K_{mB} + [B] \left(1 + \frac{K_{mA}}{[A]}\right)} \quad (1.13)$$

Na forma recíproca, quando o substrato A é o substrato variado, temos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{mA}}{V_{Max}} \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_{Max}} \left(1 + \frac{K_{mB}}{[B]}\right) \quad (1.14)$$

Para a variação do substrato B, temos:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_{mB}}{V_{Max}} \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_{Max}} \left(1 + \frac{K_{mA}}{[A]}\right) \quad (1.15)$$

O gráfico recíproco quando A é o substrato variado para diferentes concentrações fixas do substrato B fornece uma família de retas paralelas, como demonstrado na Figura 6A. Os parâmetros cinéticos K_{mA} , e V_{Max} são definidos graficamente ao plotar $1/V_{Max}^{app}$ versus $1/[B]$ (Figura 6B) ou ainda $1/K_{mA}^{app}$ versus $1/[B]$ (Figura 6C). Simetricamente, o gráfico recíproco $1/v$ versus $1/[B]$, quando o substrato B é variado, também resulta em uma família de retas paralelas e os parâmetros cinéticos K_{mB} , e V_{Max} são calculados graficamente como mencionado para o substrato A.

Figura 6. Representações gráficas do mecanismo ping-pong. A) Sistema ping-pong $1/v$ versus $1/[A]$ sob diferentes concentrações fixas do substrato B. O gráfico duplo recíproco para variação do substrato B é simétrico ao apresentado para o substrato A; B) Gráfico $1/V_{MAX}^{app}$ versus $1/[B]$ para cálculo dos parâmetros cinéticos utilizando o intercepto no eixo $1/v$; C) Gráfico $1/K_{mA}^{app}$ versus $1/[B]$, para cálculo dos parâmetros cinéticos

FONTE: Adaptado de Segel, 1975 ¹⁴⁶

Para a enzima NDPK, o NDP atua também como inibidor sem saída ou do inglês *dead-end* ²⁴, e tal comportamento pode ser oriundo da interação do produto P com a enzima livre (E). Dessa forma observa-se que o produto NDP₁ (P) é um inibidor tipo misto com relação ao substrato A, sob concentrações não saturantes de B, e um inibidor competitivo com B, sob qualquer concentração do substrato A.

A inibição sem saída por excesso de substrato resultando da combinação do substrato NDP₂ (B) com a enzima livre (E) ou ainda com a enzima na forma intermediária (F) é característico do sistema ping-pong¹⁴⁶:

Nesse sistema, o termo $K_{mA}[B]$, na equação reduzida de velocidade inicial (1.11) passa a ser multiplicado pelo termo referente a inibição $(1 + [B]/K_i)$:

$$\frac{v}{V_{Max}} = \frac{[A][B]}{K_{mB}[A] + K_{mA}[B] \left(1 + \frac{[B]}{K_i}\right) + [A][B]} \quad (1.16)$$

Nesse sistema também pode ser observado uma inibição pela interação do substrato $NTP_1(A)$ com a enzima fosforilada (F), o que promove o complexo de sem saída, FA, nesse caso o denominador $K_{mB}[A]$ da equação de velocidade (1.11) é multiplicado pelo termo $(1 + [A]/K_i)$.

Por fim, pode haver ainda uma dupla inibição por substrato onde ambos substratos $NTP_1(A)$ e $NDP_2(B)$ formam o complexo sem saída, gerando o seguinte sistema:

A equação de velocidade nesse caso se torna:

$$\frac{v}{V_{Max}} = \frac{[A][B]}{K_{mA}[B] \left(1 + \frac{[B]}{K_i}\right) + K_{mB}[A] \left(1 + \frac{[A]}{K_j}\right) + [A][B]} \quad (1.17)$$

O conhecimento do mecanismo catalítico e seus detalhes são de extrema relevância durante o desenvolvimento de ensaios enzimáticos, pois essas peculiaridades são cruciais para o correto monitoramento da atividade catalítica e, conseqüentemente, apropriada identificação de inibidores através do ensaio de atividade.

2.9. Caracterização das diferentes modalidades de inibidores

Após a identificação de um potencial candidato a inibidor, este pode ser caracterizado em termos de reversibilidade, afinidade, seletividade e mecanismo de

inibição. A reversibilidade de uma inibição é determinada, para enzimas livres em solução, a partir da atividade enzimática residual após uma rápida e ampla diluição do complexo enzima-inibidor (EI). Inibidores totalmente reversíveis podem ser caracterizados em termos de mecanismo e constante de inibição (K_i) a partir de estudos cinéticos do estado estacionário. Para estes tipos de inibidores as interações predominantes são interações fracas como hidrofóbicas, eletrostáticas, força de Van der Waals e ligação de hidrogênio.

No contexto de reações biológicas, a catálise enzimática se inicia pela formação do complexo ES, que posteriormente, gera os produtos através de uma série de etapas. Nesse contexto, um inibidor (I) pode se ligar diretamente a enzima livre para formação do complexo EI, em direta competição com o substrato e, nesse caso, o equilíbrio entre EI, E e I é definido pela constante de dissociação, K_i . Posteriormente, o complexo EI formado pode se ligar ao substrato para formar o complexo ternário, ESI. Contudo, a formação de EI, pode afetar a afinidade pelo substrato que passa a ser diferente da afinidade apresentada pela enzima livre, por esta razão, a constante de dissociação é modificada pelo fator α , e denominada K_s , que define o grau em que o inibidor afeta a afinidade da enzima pelo substrato ⁵.

O complexo ESI também pode ser formado pela ligação do inibidor ao complexo ES, também neste caso o valor de K_i é modificado pelo fator α , e este complexo é capaz de levar a formação do produto, contudo em uma velocidade menor, neste caso a constante de equilíbrio de dissociação do complexo ESI é representada por αK_i ¹⁴⁶. Assim, quatro potenciais modalidades de inibição podem ser definidas baseadas nos equilíbrios descritos acima, sendo eles os mecanismos: competitivo, acompetitivo, não competitivo e misto.

No mecanismo competitivo ($\alpha = \infty$), o inibidor se liga exclusivamente a enzima livre e compete diretamente com o substrato. A ligação do inibidor, pode ocorrer no mesmo sítio em que o substrato se liga, ou em sítio separado (alostéricos), o que promove da mesma forma uma regulação negativa.

O inibidor acompetitivo se liga exclusivamente ao complexo ES, e inibidores não competitivo e misto, ambos denominados “*non competitive*” em inglês, se ligam com alguma afinidade tanto a E quanto a ES. Para inibidores não competitivos puros a afinidade por E e ES é a mesma, ou seja, $\alpha = 1$. Já o inibidor do tipo misto apresenta afinidade diferente pela enzima livre e pelo complexo ES ($\alpha \neq 1$), para esse tipo de

inibidor quando $\alpha > 1$, o inibidor tem maior afinidade pela enzima livre e quando $\alpha < 1$ tem preferência por se ligar ao complexo ES ⁵. Essas três modalidades de inibidores afetam diferentemente os valores das constantes cinéticas K_M e V_{Max} na equação de Michelis-Menten, Eq 1.9 (Figura 7).

Figura 7. Representação do equilíbrio enzimático e a equação de Michaelis Menten para inibidores reversíveis de diferentes modalidades. A) Inibidor competitivo que possui afinidade essencialmente pela enzima livre, com $\alpha = \infty$. B) Inibidor acompetitivo que possui afinidade somente pelo complexo ES. C) Inibidor não competitivo que possui afinidade igual por E e ES, com $\alpha = 1$, e inibidor do tipo misto que apresenta diferentes afinidades por E ou ES, com $\alpha \neq 1$.

FONTE: Lima 2018

Quando identificada a interação rapidamente reversível para um inibidor, a modalidade desta molécula é diagnosticada pela linearização da equação de Michelis-Menten utilizando o gráfico Lineweaver-Burk ($1/V_{Max}^{app}$ versus $1/[S]$), também denominado duplo recíproco. As diferenças observadas nesses gráficos, bem como os efeitos produzidos nas constantes K_M e V_{Max} , como resumidas na Tabela 4, e permitem definir se o mecanismo do inibidor reversível é do tipo competitivo, acompetitivo, não competitivo ou misto.

Entretanto, frequentemente são identificados inibidores que interagem com a enzima não apenas por interações reversíveis, mas através também de uma ligação covalente durável atuando, em muitos casos, como inibidor irreversível. A ligação covalente resultante pode ser suficientemente longa, sendo irreversível dentro da

meia-vida da proteína alvo, resultando em um complexo fármaco-proteína que não está sujeito à cinética de equilíbrio clássica ¹⁴⁷.

Tabela 4. Perfil característico das diferentes modalidades de inibidores reversíveis obtidos a partir do gráfico duplo-recíproco

Modalidade do inibidor	Perfil do gráfico duplo recíproco
Competitivo	Intersecção das linhas convergem para o eixo y
Acompetitivo	Linhas paralelas
Misto, $\alpha > 1$	Intersecção das linhas convergem do lado direito do eixo y e acima do eixo x
Misto, $\alpha < 1$	Intersecção das linhas convergem do lado direito do eixo y e abaixo do eixo x
Não competitivo, $\alpha = 1$	Intersecção das linhas convergem do lado direito do eixo y e sobre o eixo x

Ademais, outras moléculas interagem com as enzimas de forma tempo dependente e são denominados "inibidores de ligação lenta" ou "*slow tight binding*". Quando na presença de um inibidor "*slow tight binding*", a interação enzima-inibidor esgota significativamente a população de moléculas de inibidores livres e, por este motivo, abordagens clássicas como Lineweaver-Burk não são apropriadas para determinar o mecanismo de ação desses inibidores. Morrison (1969) propôs uma apropriada análise para determinar a afinidade enzimática por compostos que exibem esse comportamento ¹⁴⁸. Usando a equação quadrática de Morrison adaptada por Copeland, descrita na equação 1.18, os dados da curva dose-resposta podem ser ajustados para cálculo da constante de inibição aparente K_i^{app} ^{5,148-151}.

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \frac{([E] + [I] + K_i^{app}) - \sqrt{([E] + [I] + K_i^{app})^2 - 4[E][I]}}{2[E]} \quad (1.18)$$

onde v_i e v_0 representam a velocidade inicial observada na presença e ausência do inibidor, $[E]$ a quantidade de enzima total e $[I]$ a quantidade de inibidor total do ensaio.

Como mencionado, o método clássico, duplo recíproco, é inadequado para a determinação do mecanismo de ação de inibidores "*slow tight binding*", pois nesse tipo de tratamento gráfico observa-se uma não linearidade a altas concentrações de

substrato. Para superar essa limitação e permitir a determinação do mecanismo de inibição, diversos métodos foram propostos, dentre os quais o mais difundido é a determinação de vários valores de IC_{50} do inibidor para diferentes concentrações de substrato, sob uma concentração fixa de enzima ^{5,152}. O gráfico obtido a partir dos valores de IC_{50} em função da concentração do substrato permite diferenciar os mecanismos de inibição competitivo, acompetitivo, não competitivo e misto como demonstrado na Figura 8 a seguir.

Figura 8. Representação gráfica dos valores de IC_{50} em função da concentração do substrato, representada como $[S]/K_M$ no eixo x, para inibidores do tipo “*slow tight binding*” de diferentes mecanismos. A) Curva *a* representa mecanismo competitivo. Curva *b* representa mecanismo acompetitivo. B) Curva *c* e *d* “*slow tight binding*” misto, em que *c* representa um inibidor com $\alpha = 5$, e *d* representa um inibidor com $\alpha = 0,2$.

FONTE: Adaptado e modificado de Copeland et al. (2013) ⁵

Ainda para inibidores do tipo “*slow tight binding*” o valor real de K_i para as diferentes modalidades de inibição pode ser definido com base nas equações de Cheng-Prusoff ¹⁵³, como descrito a seguir:

- Inibição competitiva :
$$K_i^{app} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right) \quad (1.19)$$

- Inibição tipo mista ($\alpha \neq 1$):
$$K_i^{app} = \frac{[S] + K_M}{(K_M/K_i) + ([S]/\alpha K_i)} \quad (1.20)$$

- Inibição não competitiva ($\alpha = 1$):
$$K_i^{app} = K_i \quad (1.21)$$

- Inibição acompetitiva:
$$K_i^{app} = \alpha K_i \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right) \quad (1.22)$$

Entretanto, todas as descrições supracitadas para caracterização de um inibidor são premissas para reações envolvendo um único substrato. O mecanismo de inibição de um composto para enzimas que catalisam uma reação bissubstrato é dependente do tipo de mecanismo que a enzima apresenta, e pode ser diferente para cada um dos substratos envolvidos na reação. Em suma, para as reações com catálise ping-pong a cinética do estado estacionário ou os estudos de inibição tempo dependente são realizados variando sistematicamente a concentração de um dos substratos sob concentração fixa e saturante do outro substrato. Posteriormente, o estudo inverso é realizado. Assim, os mecanismos de inibição competitivo, acompetitivo, não competitivo ou misto se referem a cada um dos substratos envolvidos na reação.

2 – JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

As proteínas quinases participam de processos biológicos complexos e controlam um conjunto diverso de atividades celulares, o que as tornou alvos atraentes para o tratamento de uma série de doenças ¹⁵⁻¹⁸. A enzima Nucleosídeo Difosfato Quinase B (NDPKb) é altamente conservada em várias espécies, tendo como principal função a manutenção dos níveis de trifosfatos de oxi e desoxinucleotídeos na célula, entretanto essa enzima apresenta funções distintas em diferentes organismos ²⁴. Em células de mamíferos, a NDPKb (ou NME2) é claramente uma proteína multifuncional distribuída no citoplasma, membrana plasmática e no núcleo³⁶. A NME2 regula aspectos múltiplos da fisiologia celular, incluindo produção de nucleotídeos e, consequentemente, o crescimento celular²⁴, atividade histidina quinase que regula a transdução do sinal celular ou a atividade de canais iônicos³²⁻³⁵. Essa enzima também é capaz de promover e modular a tumorigênese em diferentes ambientes celulares ³⁷⁻⁴¹, e por esta razão, tem sido descrita como potencial alvo para intervenções terapêuticas, em especial para o controle de metástase ^{46,47}. No caso de agentes patogênicos bacterianos e de protozoários tripanossomatídeos, a NDPKb atua na ativação da GTPase ⁵⁷ e na via de salvamento de purina ^{154,155}. Em *Leishmania spp.* a NDPKb controla os níveis de NTPs, e em particular interesse a quantidade de ATP extracelular (eATP), o que promove a prevenção da morte de macrófagos e conservação da integridade das células do hospedeiro em benefício do parasita ⁶². Ademais, a NDPKb tem sido associada com a resistência de algumas cepas de *Leishmania spp.* ao tratamento com Sb(V) ⁶⁷, o principal tratamento disponível para leishmaniose. Nesse âmbito, a inibição da NDPKb de protozoários de *Leishmania spp* apresenta ser uma alternativa eficiente, tanto para evitar o sucesso da infecção quanto para diminuir a resistência aos medicamentos disponíveis e, consequentemente, os inibidores de NDPKb representam ser promissores pontos de partida para o desenvolvimento de drogas leishmanicidas.

Comumente a atividade catalítica da NDPKb pode ser medida através do sistema de acoplamento com as enzimas piruvato kinase/lactato desidrogenase, no qual a hidrólise do trifosfato é acoplada à oxidação do NADH ^{74,81}. O sistema acoplado, entretanto, não é adequado para seguir as reações da NDPKb com qualquer dinucleotídeo, pois todos (exceto dTDP) são bons substratos da piruvato kinase ⁸². O uso de ensaios acoplados para a identificação de inibidores é possível, entretanto,

exigem experimentos adicionais para garantir que a inibição observada durante a triagem seja devido à inibição da enzima alvo e não devido à inibição da enzima de acoplamento ⁵, o que torna a triagem de inibidores mais laboriosa e demorada. Já as abordagens analíticas como a proposta por Lambeth e Muhonen (1993) ⁸⁸ proporcionam uma direta e sensível detecção de produtos em um modo livre de sondas marcadoras, porém inclui o consumo excessivo de enzima e tempo de análise.

Na linha de pesquisa desenvolvida por nosso grupo obtivemos sucesso no desenvolvimento de novos ensaios enzimáticos *on-line*, baseado no uso de enzimas imobilizadas em capilares de sílica ou ICER (do inglês *immobilized capillary enzyme reactor*), associados à cromatografia zonal para a identificação e caracterização de inibidores das enzimas alvo acetilcolinesterase ¹⁵⁶, butirilcolinesterase ¹²³, NTPDase ^{136,137} e β -Secretase ¹²⁵. Desse modo, diante da potencialidade das enzimas NME2 e *LmNDPKb* para intervenções terapêuticas e o sucesso alcançado com outros alvos enzimáticos, foi proposto o desenvolvimento de um inédito ensaio enzimático *on-line* utilizando as enzimas alvo imobilizadas, separadamente, a fim de superar as limitações do uso de enzimas em solução, e para acelerar a identificação e caracterização de inibidores da NDPKb.

3 – OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

- Desenvolver e caracterizar colunas capilares com as enzimas NDPKb de *Homo sapiens* (NME2) e *Leishmania major* (LmNDPKb) imobilizadas, para serem empregadas como biorreatores no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com eluição zonal para a identificação e caracterização de inibidores.

4.2. Objetivos específicos

- Expressão heteróloga e purificação das enzimas alvo NME2 e LmNDPKb, bem como a caracterização dos parâmetros cinéticos para essas enzimas livres em solução
- Estudo das condições para a imobilização das enzimas na superfície interna de tubos capilares abertos de sílica fundida para obtenção dos biorreatores
- Otimização da separação cromatográfica dos nucleotídeos envolvidos na reação de fosfotransferase e validação dos métodos analíticos *off-line* e *on-line*, para a quantificação da atividade enzimática das enzimas livres em solução e imobilizada, respectivamente
- Caracterização dos biorreatores por técnicas de microscopia eletrônica e em termos de propriedades catalíticas e parâmetros cinéticos, bem como avaliação da resistência do ICER frente a fatores desnaturantes (pH e solventes orgânicos) e o efeito da composição da fase móvel e vazão na sua atividade
- Determinação de condições experimentais balanceadas para realização da triagem de inibidores utilizando inibidores de referência previamente descritos para enzimas NDPKs e compostos obtidos a partir de triagem virtual
- Uso do inibidor de referência (-)-Epicatequina galato (ECG) como prova de conceito para demonstrar a aplicabilidade do método *on-line* na caracterização de inibidores, em termos de determinação da capacidade inibitória (IC_{50}), mecanismo de ação e constante de inibição (K_i)

6 – CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

As enzimas alvo desse estudo, *Lm*NDPKb e NME2, foram eficientemente imobilizadas em capilares de sílica fundida para a produção dos biorreatores, *Lm*NDPKb-ICER-Cov e NME2-ICER-Cov. Simultaneamente, as otimizações para separação dos nucleotídeos envolvidos na reação catalítica de fosfotransferase das enzimas alvo foram realizadas. A separação analítica por cromatografia de par iônico permitiu a quantificação direta dos substratos e produtos envolvidos na reação enzimática. Essa separação deu origem à dois métodos analíticos, o *off-line* e ao inédito método *on-line*, que foram utilizados para mensurar a atividade das enzimas livre em solução e imobilizadas, respectivamente. Utilizando esses métodos, foi possível realizar estudos de caracterização do pH ótimo e dos parâmetros cinéticos, os quais permitiram constatar que não houve alterações significativas nas propriedades catalíticas e funcionais das enzimas alvo após a imobilização. Os resultados provenientes dos estudos cinéticos do estado estacionário, associados aos estudos com inibidores de referência sob diferentes concentrações do substrato ATP, permitiram modular e definir condições balanceadas para a aplicação do método *on-line* na triagem de inibidores. O conhecido inibidor de NDPKb, (-)-Epicatequina galato (ECG), foi utilizado como prova de conceito para validar o método ICER-LC-UV como ferramenta para a aplicação na identificação e caracterização de inibidores em termos de capacidade inibitória (IC_{50}), mecanismo de ação e constante de inibição (K_i). Para a enzima NME2, os resultados obtidos para o ECG corroboram com dados já descritos. Já a inédita inibição observada para a *Lm*NDPKb na presença do ECG corrobora com demais estudos de atividade leishmanicida observada em estudos *in vitro* e *in vivo* para outros compostos polifenóis de estrutura similar ao ECG. A complementaridade desses resultados demonstra, portanto, que os estudos enzimáticos *in vitro* utilizando o método *on-line*, permite a identificação com robustez e confiabilidade, de moléculas inibidoras das enzimas alvo NME2 e *Lm*NDPKb de forma automatizada em menor tempo de análise e com a reutilização das enzimas. Além disso, o método aqui proposto possibilita a análise de 280 análises/dia, ou seja, cerca de 50 candidatos a inibidores/dia com equipamento em modo operante. Em suma, apesar dos desafios apresentados pelo tipo de mecanismo ping-pong das enzimas de interesse, o novo ensaio *on-line* para triagem de inibidores usando como abordagem enzimas imobilizadas e cromatografia por eluição zonal, mostrou ser uma promissora ferramenta e uma alternativa aos ensaios clássicos para a identificação e caracterização de inibidores da atividade de fosfotransferase das enzimas *Lm*NDPKb e NME2.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guido, R. V. C., Andricopulo, A. D. & Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. Avançados* **24**, 81–98 (2010).
2. Mestres, J. Representativity of target families in the Protein Data Bank: impact for family-directed structure-based drug discovery. *Drug Discov. Today* **10**, 1629–1637 (2005).
3. Blucher, A. S. & Mcweeney, S. K. Challenges in Secondary Analysis of High Throughput Screening Data. *Pac. Symp. Biocomput.* 114–124 (2014).
4. Dahlin, J. L. *et al.* PAINS in the Assay: Chemical Mechanisms of Assay Interference and Promiscuous Enzymatic Inhibition Observed during a Sulfhydryl-Scavenging HTS. *J. Med. Chem.* **58**, 2091–2113 (2015).
5. Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery*. (John Wiley & Sons, Inc., 2013). doi:10.1002/9781118540398
6. Koscielny, G. *et al.* Open Targets: a platform for therapeutic target identification and validation. *Nucleic Acids Res.* **45**, D985–D994 (2017).
7. Yang, Y., Franc, V. & Heck, A. J. R. Glycoproteomics: A Balance between High-Throughput and In-Depth Analysis. *Trends Biotechnol.* **35**, 598–609 (2018).
8. Riley, N. M. & Coon, J. J. Phosphoproteomics in the Age of Rapid and Deep Proteome Profiling. *Anal. Chem.* **88**, 74–94 (2016).
9. Fabbro, D., Cowan-Jacob, S. W. & Moebitz, H. Ten things you should know about protein kinases: IUPHAR Review 14. *Br. J. Pharmacol.* **172**, 2675–2700 (2015).
10. Schwartz, P. A. & Murray, B. W. Protein kinase biochemistry and drug discovery. *Bioorg. Chem.* **39**, 192–210 (2011).
11. Cheek, S., Zhang, H. & Grishin, N. V. Sequence and Structure Classification of Kinases. *J. Mol. Biol.* **320**, 855–881 (2002).
12. Cheek, S., Ginalski, K., Zhang, H. & Grishin, N. V. A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Struct. Biol.* **5**, 6 (2005).
13. Attwood, P. V & Wieland, T. Nucleoside diphosphate kinase as protein histidine kinase. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **388**, 153–160 (2015).
14. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The

- Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* (80-.). **298**, 1912–1934 (2002).
15. Wu, P., Nielsen, T. E. & Clausen, M. H. Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov. Today* **21**, 5–10 (2016).
 16. Fabbro, D. 25 Years of Small Molecular Weight Kinase Inhibitors: Potentials and Limitations. *Mol. Pharmacol.* **87**, 766–775 (2015).
 17. Noble, M. E. M., Endicott, J. A. & Johnson, L. N. Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure. *Science* (80-.). **303**, 1800–1805 (2004).
 18. Alexander, S. P. *et al.* THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: Enzymes. *Br. J. Pharmacol.* **174**, S272–S359 (2017).
 19. O'Brien, Z. & Moghaddam, M. F. Small molecule kinase inhibitors approved by the FDA from 2000 to 2011: a systematic review of preclinical ADME data. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **9**, 1597–1612 (2013).
 20. Rask-Andersen, M., Zhang, J., Fabbro, D. & Schiöth, H. B. Advances in kinase targeting: current clinical use and clinical trials. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 604–620 (2014).
 21. Kinch, M. S. An analysis of FDA-approved drugs for oncology. *Drug Discov. Today* **19**, 1831–1835 (2014).
 22. Richey, E. A. *et al.* Accelerated Approval of Cancer Drugs: Improved Access to Therapeutic Breakthroughs or Early Release of Unsafe and Ineffective Drugs? *J. Clin. Oncol.* **27**, 4398–4405 (2009).
 23. Grant, S. K. Therapeutic Protein Kinase Inhibitors. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 1163–1177 (2009).
 24. Lascu, I. & Gonin, P. The Catalytic Mechanism of Nucleoside Diphosphate Kinases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 237–246 (2000).
 25. Steeg, P. S. *et al.* Evidence for a Novel Gene Associated With Low Tumor Metastatic Potential. *J. Natl. Cancer Inst.* **80**, 200–204 (1988).
 26. Hsu, T., Steeg, P. S., Zollo, M. & Wieland, T. Progress on Nme (NDP kinase/Nm23/Awd) gene family-related functions derived from animal model systems: studies on development, cardiovascular disease, and cancer metastasis exemplified. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* **388**, 109–117 (2015).

27. Wagner, P. D. & Vu, N.-D. Phosphorylation of ATP-Citrate Lyase by Nucleoside Diphosphate Kinase. *J. Biol. Chem.* **270**, 21758–21764 (1995).
28. Srivastava, S. *et al.* Histidine Phosphorylation of the Potassium Channel KCa3.1 by Nucleoside Diphosphate Kinase B Is Required for Activation of KCa3.1 and CD4 T Cells. *Mol. Cell* **24**, 665–675 (2006).
29. Boissan, M. *et al.* The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement. *Mol. Cell. Biochem.* **329**, 51–62 (2009).
30. Webb, P. A., Perisic, O., Mendola, C. E., Backer, J. M. & Williams, R. L. The Crystal Structure of Human Nucleoside Diphosphate Kinase, NM23-H2. *J. Mol. Biol.* **251**, 574–587 (1995).
31. Moréra, S., Lacombe, M.-L., Yingwu, X., LeBras, G. & Janin, J. X-ray structure of human nucleoside diphosphate kinase B complexed with GDP at 2 Å resolution. *Structure* **3**, 1307–1314 (1995).
32. Cai, X., Srivastava, S., Surindran, S., Li, Z. & Skolnik, E. Y. Regulation of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5 by reversible histidine phosphorylation mediated by NDPK-B and PHPT1. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1244–1250 (2014).
33. Cuello, F. *et al.* Activation of Heterotrimeric G Proteins by a High Energy Phosphate Transfer via Nucleoside Diphosphate Kinase (NDPK) B and Gβ Subunits: COMPLEX FORMATION OF NDPK B WITH Gβγ DIMERS AND PHOSPHORYLATION OF His-266 IN Gβ . *J. Biol. Chem.* **278**, 7220–7226 (2003).
34. Srivastava, S. *et al.* Histidine Phosphorylation of the Potassium Channel KCa3.1 by Nucleoside Diphosphate Kinase B Is Required for Activation of KCa3.1 and CD4 T Cells. *Mol. Cell* **24**, 665–675 (2006).
35. Muimo, R. *et al.* Histidine Phosphorylation of Annexin I in Airway Epithelia. *J. Biol. Chem.* **275**, 36632–36636 (2000).
36. Dexheimer, T. S. *et al.* NM23-H2 may play an indirect role in transcriptional activation of c-myc gene expression but does not cleave the nuclease hypersensitive element III₁ Mol. Cancer Ther. **8**, 1363 LP-1377 (2009).
37. Anzinger, J., Malmquist, N. A., Gould, J. & Buxton, I. L. O. Secretion of a nucleoside diphosphate kinase (Nm23-H2) by cells from human breast, colon, pancreas and lung tumors. in *Proceedings of the Western Pharmacology Society*

- 44**, 61–64 (2001).
38. Hamby, C. V *et al.* Expression of a catalytically inactive H118Y mutant of nm23-H2 suppresses the metastatic potential of line IV CI 1 human melanoma cells. *Int. J. Cancer* **88**, 547–553 (2000).
 39. Lee, M.-J. *et al.* Pro-oncogenic potential of NM23-H2 in hepatocellular carcinoma. *Exp. & Mol. Med.* **44**, 214 (2011).
 40. Rumjahn, S. M., Javed, M. A., Wong, N., Law, W. E. & Buxton, I. L. O. Purinergic regulation of angiogenesis by human breast carcinoma-secreted nucleoside diphosphate kinase. *Br. J. Cancer* **97**, 1372–1380 (2007).
 41. Yokdang, N., Buxton, N. D. & Buxton, I. L. O. Measurement of human breast tumor cell-secreted shNDPK-B in a murine breast cancer model suggests its role in metastatic progression. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **52**, 88–91 (2009).
 42. Yokdang, N., Nordmeier, S., Speirs, K., Burkin, H. R. & Buxton, I. L. O. Blockade of extracellular NM23 or its endothelial target slows breast cancer growth and metastasis. *Integr. cancer Sci. Ther.* **2**, 192 (2015).
 43. Bouvard, C. *et al.* Small molecule selectively suppresses MYC transcription in cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 3497–3502 (2017).
 44. Li, Y., Tong, Y. & Wong, Y. H. Regulatory functions of Nm23-H2 in tumorigenesis: insights from biochemical to clinical perspectives. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **388**, 243–256 (2015).
 45. Thakur, R. K. *et al.* Non-metastatic 2 (NME2)-mediated suppression of lung cancer metastasis involves transcriptional regulation of key cell adhesion factor vinculin. *Nucleic Acids Res.* **42**, 11589–11600 (2014).
 46. Romani, P., Ignesti, M., Gargiulo, G., Hsu, T. & Cavaliere, V. Extracellular NME proteins: a player or a bystander? *Lab. Investig.* (2017).
 47. Kar, A. & Chowdhury, S. Inhibition of telomerase activity by NME2: impact on metastasis suppression? *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **388**, 235–241 (2015).
 48. World Health Organization. Leishmaniasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Accessed 07 Sep 2016.
 49. Werneck, G. L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? *Cad. Saude Publica* **32**, (2016).
 50. de Menezes, J. P. B., Guedes, C. E. S., Petersen, A. L. de O. A., Fraga, D. B.

- M. & Veras, P. S. T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–11 (2015).
51. Wheeler, R. J., Gluenz, E. & Gull, K. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol. Microbiol.* **79**, 647–662 (2011).
 52. Antoine, J. C., Prina, E., Jouanne, C. & Bongrand, P. Parasitophorous vacuoles of Leishmania amazonensis-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* **58**, 779–787 (1990).
 53. Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R. A. I., Maes, L. & Cos, P. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 337–351 (2011).
 54. Kaye, P. & Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 604 (2011).
 55. Alcolea, P. J. *et al.* Transcriptomics throughout the life cycle of Leishmania infantum: High down-regulation rate in the amastigote stage. *Int. J. Parasitol.* **40**, 1497–1516 (2010).
 56. Idzko, M., Ferrari, D. & Eltzschig, H. K. Nucleotide signalling during inflammation. *Nature* **509**, 310 (2014).
 57. Chopra, P. *et al.* Cytotoxic activity of nucleoside diphosphate kinase secreted from Mycobacterium tuberculosis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 625–634 (2003).
 58. Yilmaz, Ö. *et al.* ATP scavenging by the intracellular pathogen Porphyromonas gingivalis inhibits P2X7-mediated host-cell apoptosis. *Cell. Microbiol.* **10**, 863–875 (2008).
 59. Zaborina, O. *et al.* Secreted products of a nonmucoid Pseudomonas aeruginosa strain induce two modes of macrophage killing: external-ATP-dependent, P2Z-receptor-mediated necrosis and ATP-independent, caspase-mediated apoptosis. *Microbiology* **146**, 2521–2530 (2000).
 60. Gounaris, K., Thomas, S., Najarro, P. & Selkirk, M. E. Secreted Variant of Nucleoside Diphosphate Kinase from the Intracellular Parasitic Nematode Trichinella spiralis . *Infect. Immun.* **69**, 3658–3662 (2001).
 61. Punj, V. *et al.* Phagocytic Cell Killing Mediated by Secreted Cytotoxic Factors of Vibrio cholerae . *Infect. Immun.* **68**, 4930–4937 (2000).
 62. Kolli, B. K., Kostal, J., Zaborina, O., Chakrabarty, A. M. & Chang, K.-P.

- Leishmania-released nucleoside diphosphate kinase prevents ATP-mediated cytolysis of macrophages. *Mol. Biochem. Parasitol.* **158**, 163–175 (2008).
63. Dar, H. H., Prasad, D., Varshney, G. C. & Chakraborti, P. K. Secretory nucleoside diphosphate kinases from both intra- and extracellular pathogenic bacteria are functionally indistinguishable. *Microbiology* **157**, 3024–3035 (2011).
 64. Cantacessi, C., Dantas-Torres, F., Nolan, M. J. & Otranto, D. The past, present, and future of Leishmania genomics and transcriptomics. *Trends Parasitol.* **31**, 100–108 (2015).
 65. Akhoundi, M. *et al.* Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol. Aspects Med.* **57**, 1–29 (2017).
 66. Moreira, D. S. *et al.* Phosphoproteomic analysis of wild-type and antimony-resistant Leishmania braziliensis lines by 2D-DIGE technology. *Proteomics* **17**, (2015).
 67. Moreira, D. S. & Murta, S. M. F. Involvement of nucleoside diphosphate kinase b and elongation factor 2 in Leishmania braziliensis antimony resistance phenotype. *Parasites {&} Vectors* **9**, 641 (2016).
 68. Ogungbe, I. V., Erwin, W. R. & Setzer, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: Molecular docking to potential protein targets. *J. Mol. Graph. Model.* **48**, 105–117 (2014).
 69. Ogungbe, V. I. & Setzer, N. W. In-silico Leishmania Target Selectivity of Antiparasitic Terpenoids. *Molecules* **18**, (2013).
 70. Souza, T. A. C. B. *et al.* Molecular adaptability of nucleoside diphosphate kinase b from trypanosomatid parasites: stability, oligomerization and structural determinants of nucleotide binding. *Mol. Biosyst.* **7**, 2189–2195 (2011).
 71. Tonoli, C. C. C. *et al.* Production, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the nucleoside diphosphate kinase b from Leishmania major. *Acta Crystallogr. Sect. F* **65**, 1116–1119 (2009).
 72. Anciaux, K., Van Dommelen, K., Willems, R., Roymans, D. & Slegers, H. Inhibition of nucleoside diphosphate kinase (NDPK/nm23) by cAMP analogues. *FEBS Lett.* **400**, 75–79 (1997).
 73. MacDonald, N. J., la Rosa, D. & Steeg, P. S. The potential roles of nm23 in cancer metastasis and cellular differentiation. *Eur. J. Cancer* **31**, 1096–1100 (1995).

74. Agarwal, R. P. & Parks, R. E. Erythrocytic Nucleoside Diphosphokinase: V. SOME PROPERTIES AND BEHAVIOR OF THE pI 7.3 ISOZYME . *J. Biol. Chem.* **246**, 2258–2264 (1971).
75. Semianrio-Vidal, L., van Hesuden, C., Mugesh, G. & Lazarowski, E. R. Ebselen is a potent non-competitive inhibitor of extracellular nucleoside diphosphokinase. *Purinergic Signal.* **6**, 383–391 (2010).
76. Malmquist, N. A., Anzinger, J. J., Hirzel, D. & Buxton, I. L. Ellagic acid inhibits nucleoside diphosphate kinase-B activity. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **44**, 57–59 (2001).
77. Buxton, I. L. O. Inhibition of Nm23H2 gene product (NDPK-B) by angiostatin, polyphenols and nucleoside analogs. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **51**, 30–34 (2008).
78. Strelkov, S. V, Perisic, O., Webb, P. A. & Williams, R. L. The 1.9 Å Crystal Structure of a Nucleoside Diphosphate Kinase Complex with Adenosine 3', 5'-Cyclic Monophosphate: Evidence for Competitive Inhibition. *J. Mol. Biol.* **249**, 665–674 (1995).
79. Valenti, D., Barile, M., Quagliariello, E. & Passarella, S. Inhibition of nucleoside diphosphate kinase in rat liver mitochondria by added 3'-azido-3'-deoxythymidine. *FEBS Lett.* **444**, 291–295 (1999).
80. Mishra, A. K. *et al.* Discovery of novel inhibitors for Leishmania nucleoside diphosphatase kinase (NDK) based on its structural and functional characterization. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 1–16 (2017).
81. Parks, R. E. J. & Agarwal, R. P. Nucleoside Diphosphokinases. in *The Enzymes* (ed. Press, A.) **8**, 307–334 (1973).
82. Schaertl, S., Konrad, M. & Geeves, M. A. Substrate specificity of human nucleoside-diphosphate kinase revealed by transient kinetic analysis. *J. Biol. Chem.* **273**, 5662–9 (1998).
83. Karamohamed, S., Nordström, T. & Nyrén, P. Real-Time Bioluminometric Method for Detection of Nucleoside Diphosphate Kinase Activity. *Biotechniques* **26**, 728–734 (1999).
84. Sundin, G. W., Shankar, S. & Chakrabarty, A. M. Mutational analysis of nucleoside diphosphate kinase from *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of critical amino acid residues involved in exopolysaccharide alginate synthesis.

- J. Bacteriol.* **178**, 7120–7128 (1996).
85. Chopade, B. A., Shankar, S., Sundin, G. W., Mukhopadhyay, S. & Chakrabarty, A. M. Characterization of membrane-associated *Pseudomonas aeruginosa* Ras-like protein Pra, a GTP-binding protein that forms complexes with truncated nucleoside diphosphate kinase and pyruvate kinase to modulate GTP synthesis. *J. Bacteriol.* **179**, 2181–2188 (1997).
 86. Arumugam, M. & Ajitkumar, P. Histidine 117 in the His-Gly-Ser-Asp motif is Required for the Biochemical Activities of Nucleoside Diphosphate Kinase of *Mycobacterium smegmatis*. *Open Biochem. J.* **6**, 71–77 (2012).
 87. Cashel, M., Lazzarini, R. A. & Kalbacher, B. An improved method for thin-layer chromatography of nucleotide mixtures containing ³²P-labeled orthophosphate. *J. Chromatogr. A* **40**, 103–109 (1969).
 88. Lambeth, D. O. & Muhonen, W. W. The direct assay of kinases and acyl-CoA synthetases by HPLC: application to nucleoside diphosphate kinase and succinyl-CoA synthetase. *Analytical biochemistry* **209**, 192–8 (1993).
 89. Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. & Stevanato, R. Enzyme immobilization: an update. *J. Chem. Biol.* **6**, 185–205 (2013).
 90. Homaei, A. & Etemadipour, R. Improving the activity and stability of actinidin by immobilization on gold nanorods. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 1176–1181 (2015).
 91. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451–1463 (2007).
 92. Mateo, C. *et al.* Immobilization–Stabilization of Enzymes by Multipoint Covalent Attachment on Supports Activated With Epoxy Groups. in *Immobilization of enzymes and cells* (ed. Guisan, J. M.) **2**, 47–55 (Humana Press Inc, 2006).
 93. Homaei, A. Enzyme Immobilization and its Application in the Food Industry. *Adv. Food Biotechnol.* 145 (2015).
 94. Rao, C. S., Sathish, T., Ravichandra, P. & Prakasham, R. S. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochem.* **44**, 262–268 (2009).
 95. Verma, M. L., Puri, M. & Barrow, C. J. Recent trends in nanomaterials immobilised enzymes for biofuel production. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 108–119

- (2016).
96. da Costa, J. P., Oliveira-Silva, R., Daniel-da-Silva, A. L. & Vitorino, R. Bionanoconjugation for Proteomics applications — An overview. *Biotechnol. Adv.* **32**, 952–970 (2014).
 97. Bosio, V. E., Islan, G. A., Martínez, Y. N., Durán, N. & Castro, G. R. Nanodevices for the immobilization of therapeutic enzymes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 447–464 (2016).
 98. Brena, B. M. & Batista-Viera, F. Immobilization of enzymes: a literature survey. *Immobil. Enzym. cells* 15–30 (2006).
 99. Guisan, J. M. *Immobilization of enzymes and cells*. **22**, (Springer, 2006).
 100. Krishnamoorthi, S., Banerjee, A. & Roychoudhury, A. Immobilized enzyme technology: potentiality and prospects. *J Enzym. Metab.* **1**, 104 (2015).
 101. Tachibana, S., Suzuki, M. & Asano, Y. Application of an enzyme chip to the microquantification of L-phenylalanine. *Anal. Biochem.* **359**, 72–78 (2006).
 102. Lima, J. M., Salmazo Vieira, P., Cavalcante de Oliveira, A. H. & Cardoso, C. L. Label-free offline versus online activity methods for nucleoside diphosphate kinase b using high performance liquid chromatography. *Analyst* **141**, 4733–4741 (2016).
 103. Lorena Betancor Noelia Alonso-Morales, Gisella Dellamora, Cesar Mateo, Roberto Fernandez-Lafuente, Jose M. Guisan, F. L.-G. Glutaraldehyde in Protein Immobilization: A Versatile Reagent. in *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells* (ed. Guisan, J. M.) **Second Edi**, 57–64 (Humana Press, 2006).
 104. Melo, R. R. de *et al.* New Heterofunctional Supports Based on Glutaraldehyde-Activation: A Tool for Enzyme Immobilization at Neutral pH. *Molecules* **22**, (2017).
 105. Santos, J. C. S. dos *et al.* Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. *ChemCatChem* **7**, 2413–2432 (2015).
 106. Zucca, P., Fernandez-Lafuente, R. & Sanjust, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. *Molecules* **21**, (2016).
 107. Joseph, K. S. & Hage, D. S. Characterization of the binding of sulfonylurea drugs to HSA by high-performance affinity chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **878**, 1590–1598 (2010).

108. Forsberg, E. M., Green, J. R. A. & Brennan, J. D. Continuous Flow Immobilized Enzyme Reactor–Tandem Mass Spectrometry for Screening of AChE Inhibitors in Complex Mixtures. *Anal. Chem.* **83**, 5230–5236 (2011).
109. Vanzolini, K. L., Vieira, L. C. C., Corrêa, A. G., Cardoso, C. L. & Cass, Q. B. Acetylcholinesterase Immobilized Capillary Reactors–Tandem Mass Spectrometry: An On-Flow Tool for Ligand Screening. *J. Med. Chem.* **56**, 2038–2044 (2013).
110. Singh, N., Ravichandran, S., Norton, D. D., Fugmann, S. D. & Moaddel, R. Synthesis and characterization of a SIRT6 open tubular column: Predicting deacetylation activity using frontal chromatography. *Anal. Biochem.* **436**, 78–83 (2013).
111. Hage, D. S. *et al.* Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**, 93–105 (2012).
112. Vilela, A. F. L. *et al.* Aminonaphthoquinone mannich bases derived from lawsone and their copper(II) complex derivatives: Synthesis and potential cholinesterase inhibitors as identified by on-flow assay. *J. Braz. Chem. Soc.* **27**, 534–545 (2016).
113. Calleri, E. *et al.* Trypsin-Based Monolithic Bioreactor Coupled On-Line with LC/MS/MS System for Protein Digestion and Variant Identification in Standard Solutions and Serum Samples. *J. Proteome Res.* **4**, 481–490 (2005).
114. Wang, C., Gao, M., Zhang, P. & Zhang, X. Efficient Proteolysis of Glycoprotein Using a Hydrophilic Immobilized Enzyme Reactor Coupled with MALDI-QIT-TOF-MS Detection and μ HPLC Analysis. *Chromatographia* **77**, 413–418 (2014).
115. Han, W. *et al.* Pepsin immobilization on an aldehyde-modified polymethacrylate monolith and its application for protein analysis. *J. Biosci. Bioeng.* **119**, 505–510 (2015).
116. de Moraes, M. C., Vanzolini, K. L., Cardoso, C. L. & Cass, Q. B. New trends in LC protein ligand screening. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **87**, 155–166 (2014).
117. Draczkowski, P., Matosiuk, D. & Jozwiak, K. Affinity chromatography as a tool for quantification of interactions between drug molecules and their protein targets. in *Affinity Chromatography* (InTech, 2012).

118. Betancor, L. *et al.* Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. *Enzyme Microb. Technol.* **39**, 877–882 (2006).
119. Andreescu, S., Bucur, B. & Marty, J.-L. Affinity immobilization of tagged enzymes. in *Immobilization of enzymes and cells* 97–106 (Springer, 2006).
120. Girelli, A. M. & Mattei, E. Application of immobilized enzyme reactor in on-line high performance liquid chromatography: A review. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **819**, 3–16 (2005).
121. Beigi, F., Chakir, K., Xiao, R.-P. & Wainer, I. W. G-Protein-Coupled Receptor Chromatographic Stationary Phases. 2. Ligand-Induced Conformational Mobility in an Immobilized β 2 -Adrenergic Receptor. *Anal. Chem.* **76**, 7187–7193 (2004).
122. Chen, J. & Hage, D. S. Quantitative analysis of allosteric drug-protein binding by biointeraction chromatography. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1445–1448 (2004).
123. Vilela, A. F. L. *et al.* Immobilized cholinesterases capillary reactors on-flow screening of selective inhibitors. *J. Chromatogr. B* **968**, 87–93 (2014).
124. Seidl, C., Correia, B. L., Stinghen, A. E. M. & Santos, C. A. M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* **65 C**, 440–444 (2010).
125. Ferreira Lopes Vilela, A. & Cardoso, C. L. On-flow Assay for Screening of [small beta]-Secretase Ligands by Immobilized Capillary Reactor-Mass Spectrometry. *Anal. Methods* (2017). doi:10.1039/C7AY00284J
126. Zhu, H. *et al.* Global Analysis of Protein Activities Using Proteome Chips. *Science* (80-.). **293**, 2101 LP-2105 (2001).
127. Brekkan, E., Lundqvist, A. & Lundahl, P. Immobilized Membrane Vesicle or Proteoliposome Affinity Chromatography. Frontal Analysis of Interactions of Cytochalasin B and d-Glucose with the Human Red Cell Glucose Transporter. *Biochemistry* **35**, 12141–12145 (1996).
128. Yang, Q. & Lundahl, P. Immobilized Proteoliposome Affinity Chromatography for Quantitative Analysis of Specific Interactions between Solutes and Membrane Proteins. Interaction of Cytochalasin B and D-Glucose with the Glucose Transporter Glut1. *Biochemistry* **34**, 7289–7294 (1995).
129. Sanghvi, M., Moaddel, R., Frazier, C. & Wainer, I. W. Synthesis and Characterization of Liquid Chromatographic Columns Containing the

- Immobilized Ligand Binding Domain of the Estrogen Related Receptor α and Estrogen Related Receptor γ . *J. Pharm. Biomed. Anal.* **53**, 777–780 (2010).
130. Calleri, E., Temporini, C. & Massolini, G. Frontal affinity chromatography in characterizing immobilized receptors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **54**, 911–925 (2011).
 131. de Moraes, M. C. *et al.* Evaluation of capillary chromatographic supports for immobilized human purine nucleoside phosphorylase in frontal affinity chromatography studies. *J. Chromatogr. A* **1338**, 77–84 (2014).
 132. Hage, D. S. *et al.* Chapter 12 - Affinity chromatography. in *Liquid Chromatography (Second Edition)* (eds. Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F. & Riekkola, M.-L.) 319–341 (Elsevier, 2017). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00012-9>
 133. Schiel, J., S Joseph, K. & Hage, D. *Biointeraction Affinity Chromatography: General Principles and Recent Developments. Advances in chromatography* **48**, (2010).
 134. Matsuda, R., Li, Z., Zheng, X. & Hage, D. S. Analysis of Multi-Site Drug-Protein Interactions by High-Performance Affinity Chromatography: Binding by Glimepiride to Normal or Glycated Human Serum Albumin. *J. Chromatogr. A* **1408**, 133–144 (2015).
 135. Cass, Q. & Cassiano, N. *Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações*. (Elsevier Editora Ltda., 2015).
 136. Calil, F. A. *et al.* Immobilization of NTPDase-1 from Trypanosoma cruzi and Development of an Online Label-Free Assay. *J. Anal. Methods Chem.* **2016**, 1–9 (2016).
 137. Magalhães, L. *et al.* Label-free assay based on immobilized capillary enzyme reactor of Leishmania infantum nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (LicNTPDase-2-ICER-LC/UV). *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1008**, 98–107 (2016).
 138. Cardoso, C. L. *et al.* The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma cruzi: the effect of species' specific differences on the immobilization. *Analyst* **133**, 93–99 (2008).
 139. De Moraes, M. C., Cardoso, C. L. & Cass, Q. B. Immobilized purine nucleoside

- phosphorylase from *Schistosoma mansoni* for specific inhibition studies. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, (2013).
140. Calleri, E. *et al.* Immobilized purine nucleoside phosphorylase from *Aeromonas hydrophila* as an on-line enzyme reactor for biocatalytic applications. *J. Chromatogr. B* **968**, 79–86 (2014).
 141. Cornelio, V. E. *et al.* Cathepsin D immobilized capillary reactors for on-flow screening assays. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (2018). doi:<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.001>
 142. Yang, J. & Hage, D. S. Role of binding capacity versus binding strength in the separation of chiral compounds on protein-based high-performance liquid chromatography columns Interactions of d- and l-tryptophan with human serum albumin. *J. Chromatogr. A* **725**, 273–285 (1996).
 143. Calleri, E. *et al.* Frontal affinity chromatography with MS detection of the ligand binding domain of PPAR γ receptor: Ligand affinity screening and stereoselective ligand–macromolecule interaction. *J. Chromatogr. A* **1232**, 84–92 (2012).
 144. Voet, D., Voet, J. G. & Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level, 4th Edition: Life at the Molecular Level.* (Wiley, 2011).
 145. Briggs, G. E. & Haldane, J. B. S. A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.* **19**, 338–339 (1925).
 146. Segel, I. H. *Enzyme Kinetics.* (John Wiley & Sons, 1975).
 147. Bauer, R. A. Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov. Today* **20**, 1061–1073 (2015).
 148. Morrison, J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Enzymology* **185**, 269–286 (1969).
 149. Morrison, J. F. & Walsh, C. T. The Behavior and Significance of Slow-Binding Enzyme Inhibitors. in *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 61* 201–301 (Wiley Online Library, 2006). doi:10.1002/9780470123072.ch5
 150. Morrison, J. F. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends Biochem. Sci.* **7**, 102–105 (1982).
 151. Williams, J. W. & Morrison, J. F. The kinetics of reversible tight-binding inhibition.

- Methods Enzymol.* **63**, 437–467 (1979).
152. Henderson, P. J. F. A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.* **127**, 321–333 (1972).
 153. Yung-Chi, C. & Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
 154. Martin, J. L. *et al.* Metabolic Reprogramming during Purine Stress in the Protozoan Pathogen *Leishmania donovani*. *PLoS Pathog* **10**, e1003938 (2014).
 155. Boitz, J. M., Ullman, B., Jardim, A. & Carter, N. S. Purine salvage in *Leishmania*: complex or simple by design? *Trends Parasitol.* **28**, 345–352 (2012).
 156. da Silva, J. I. *et al.* Acetylcholinesterase capillary enzyme reactor for screening and characterization of selective inhibitors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **73**, 44–52 (2013).