UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo do mecanismo e inibição da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Orientada: Renata Almeida Garcia Reis
Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Nonato Costa

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 05/07/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

RESUMO

ALMEIDA GARCIA REIS, R. **Estudo do mecanismo e inibição da enzima diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major***. 2016. 184f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Diidroorotato desidrogenases (DHODHs) catalisam a quarta e única reação de oxidorredução na via de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, que envolve a oxidação do diidroorotato (DHO) a orotato (ORO) em um mecanismo dependente do cofator FMN e de aceptores de elétrons. A relevância de pirimidinas para a proliferação e manutenção celular determina a DHODH como um potencial alvo terapêutico. DHODHs são divididas em duas classes baseado em comparações estruturais e na sequência de resíduos: classe 1, a qual é subdividida em classe 1A e 1B, e classe 2. A proteína utilizada como modelo em nosso estudo sobre as DHODHs de tripanosomatídeos classe 1A é a enzima de *Leishmania major* (*Lm*DHODH). As metas principais desse trabalho foram de contribuir para a compreensão sobre o mecanismo de ação das DHODHs de classe 1A e propor estratégias de inibição seletiva. Inicialmente, ensaios no estado estacionário e pré-estacionário foram realizados para caracterização do ciclo catalítico da *Lm*DHODH e permitiram a análise das etapas redutivas e oxidativa de forma independente e sua comparação com o ciclo global. Foi também analisada a interação da *Lm*DHODH com os produtos da reação por meio de ensaios de cinética, titulação espectral e titulação isotérmica calorimétrica. Após análises topológicas baseadas na estrutura cristalográfica da *Lm*DHODH, diferentes mutantes foram construídos e caracterizados estruturalmente e cineticamente a fim de investigar a importância de alguns sítios na conformação protéica. Durante a etapa de busca de inibidores, bibliotecas químicas de compostos foram analisadas por meio de interferometria de biocamada e ensaio enzimático. Considerando os resultados obtidos, foi possível pela primeira vez identificar um mecanismo cinético cooperativamente positivo frente à ligação do DHO com coeficiente de Hill (*h*) próximo a 2. Além disso, nossos resultados mostram que o grau da cooperatividade na ligação do DHO é afetado pelo ORO. A comparação entre os parâmetros obtidos para o estado estacionário e pré-estacionário aliada aos estudos da interação da *Lm*DHODH com os produtos da reação, sugerem que a liberação do ORO é a etapa limitante na velocidade global da reação, o que não é verdade para a enzima humana (DHODH classe 2). A partir das análises dos mutantes, foi possível correlacionar o comportamento cooperativo da enzima *Lm*DHODH com a conversa cruzada entre os sítios-ativos mediada pela interface dimérica. Além disso, foi possível observar que a dinâmica conformacional do *loop* catalítico é extremamente relevante no mecanismo global da reação e existe uma correlação entre os rearranjos do *loop* catalítico e a interface dimérica. Nossos resultados fornecem uma importante contribuição para o entendimento dos detalhes do mecanismo catalítico adotado pelas DHODHs de classe 1A. Eles também revelam diferenças chave no mecanismo adotado pelas enzimas de classe 1A e classe 2, os quais podem ser explorados no desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos contra a *Lm*DHODH. No que se refere à busca por inibidores, alguns *hits* foram obtidos por meio da varredura da biblioteca de fragmentos do *Drug Discovery Unit* (DDU) utilizando interferometria de biocamadas. Além disso, um ensaio enzimático de larga escala (*hightroughtput*) foi desenvolvido para a *Lm*DHODH e permitiu a triagem de alto desempenho nas bibliotecas de fragmentos e diversidade química. Hits foram validados por meio de ensaio de potência e bons inibidores foram encontrados em ambas as bibliotecas. As varreduras identificaram diferentes séries de compostos como pontos de partida para química medicinal e investigações estruturais. Dois hits identificados a partir da biblioteca de diversidade química apresentam excelentes valores de IC50, 260 nM e 1,07 μM.

Palavras-chave: Diidroorotato desidrogenases classe 1A, mecanismo, inibição.

ABSTRACT

ALMEIDA GARCIA REIS, R. **Studies of the mechanism and inhibition of dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania major*.** 2016. 184f. Thesis of Doctoral. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Dihydroorotate dehydrogenases (DHODHs) catalyze the fourth and only redox reaction in *the de novo* pyrimidine biosynthetic pathway, the oxidation of dihydroorotate (DHO) to orotate (ORO) through a mechanism dependent on the FMN cofactor and electron acceptors. The significance of pyrimidine for cell proliferation and maintenance determine DHODH as potential therapeutic target. DHODHs have been distinguished in two major classes based on sequence and structural comparisons: class 1, which is further divided into subclasses 1A and 1B, and class 2. The model protein in our studies on trypanosomatid class 1A DHODHs is the enzyme from *Leishmania major* (*Lm*DHODH). The essential question in this study was to contribute for the understanding about the catalytic and inhibition mechanisms of class 1A DHODHs . First, steady-state and pre-steady state kinetic approaches have been used to characterize the catalytic cycle of *Lm*DHODH and have allowed the comparison between the global cycle and each independent half-reaction. Also, the interaction of *Lm*DHODH with the products of the reaction was analyzed by kinetic, spectral titration and *isothermal titration calorimetry assays.* After topographical analysis based on the *Lm*DHODH crystallographic structure, different mutants were constructed and structurally and kinetically *characterized*. For inhibitor search, chemical libraries of compounds were screened by using biolayer interferometry binding and enzymatic assays. Based on our results, for the first time, steady-state kinetics analysis of class 1A allowed the observation of a positive cooperativity for DHO binding with a Hill coefficient (*h*) value close to 2. Moreover, our results show that the degree of cooperativity in DHO binding is affected by ORO. Comparison between steady and pre-steady-state parameters together with studies of interaction for *Lm*DHODH with both products, suggests that ORO release is the rate-limiting step in overall catalysis with is not true to the human enzyme (class 2 DHODH). The hybrid approach used to characterize *Lm*DHODH mutants allowed us to propose that the cooperative behavior is related with the cross-talk between the two active sites mediated by the dimer interface. Also, the conformational dynamics of the catalytic *loop* is very relevant in the global mechanism of the reaction and there is a correlation between catalytic loop rearrangement and dimer interface. Our results bring an important contribution for a better understanding of the detailed catalytic mechanism adopted by class 1A DHODHs. They also reveal key differences in the enzymatic mechanism adopted by class 1A and class 2 DHODHs, to be exploited in the development of potent and selective *Lm*DHODH inhibitors. Regarding to inhibitors search, few hits were obtained by using screening of Drug Discovery Unit (DDU) fragment library with biolayer interferometry binding assay. Also, an end-point enzymatic assay was developed for *Lm*DHODH and the optimisation carried out at the DDU provided a reliable HTP assay using both DDU's fragment library and small diversity set. Hits were validated using a potency assay with good inhibitors found using both libraries. The screens identified a number of series as starting points for medicinal chemistry and structural investigations. Two hits identified from small diversity set exhibit great IC50 values, 260 nM and 1.07 μM.

Keywords: Dihydroorotate dehydrogenases class 1A, mechanism, inhibition

INTRODUÇÃO

1.0 Introdução

Nesta tese serão apresentadas e discutidas as contribuições relativas à obtenção dos resultados relacionados ao mecanismo catalítico e inibição da flavoenzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) de *Leishmania major*. A enzima DHODH participa da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, uma importante via metabólica, altamente conservada em eucariotos e procariotos e tem sido considerada um importante alvo para o desenvolvimento de moléculas com ação aniproliferativa e antiparasitária.

A pergunta que orientou este trabalho consiste em última instância em compreender como funcionam as DHODHs e de que forma elas podem ser inibidas. Diferentes ferramentas foram utilizadas na busca por estender nosso conhecimento em termos moleculares e dinâmicos sobre estas enzimas.

No início desta tese serão apresentados conceitos gerais de primeiros princípios a respeito da catálise enzimática imprescindíveis para a descrição dos nossos modelos e interpretação dos resultados.

Adiante serão fornecidas informações específicas a respeito da enzima e do contexto metabólico no qual ela está inserida, assim como sua relevância enquanto possível alvo terapêutico.

1.1 Como as enzimas funcionam?

1.1.1 Da força vital à força catalítica

Desde o início da história, uma das questões mais fundamentais foi a necessidade do homem em diferenciar seres vivos de objetos inanimados. A essência desta questão nos remete, em níveis mais profundos, à busca do homem em compreender a vida.

Especulações a respeito da natureza da vida são encontradas no pensamento de Aristóteles, ou antes, com Tales de Mileto, que buscava um elemento primordial, a matéria primitiva de que seriam compostos todos os seres. Ainda que as proposições iniciais que emergiram do pensamento grego e de sociedades ditas pré-científicas a respeito da matéria, da vida e do que compõe o universo nos pareçam hoje esboços bastante rudimentares quando comparados ao sofisticado conhecimento molecular acumulado ao longo do século XX, é imprescindível considerar que estas primeiras proposições enunciam em si algo sobre a origem das coisas e o fazem sem imagem e fabulação, tendo nisso grande mérito. O pensamento e a ciência experimental são ambos ofícios dos investigadores da natureza que

permeiam todas as sociedades. O caminho do pensamento ao longo das gerações é, por si, o caminho do desenvolvimento de todas as ciências.

Quando o homem se depara com a observação de que coisas vivas são intrinsicamente diferentes de objetos inanimados, algumas vertentes de pensamento são fundadas. Sob uma perspectiva muito simples, a questão básica que desafiava o pensamento no século XVIII e XIX era: Os eventos em organismos vivos poderiam ser explicados pelas mesmas leis que governavam o comportamento de substâncias inorgânicas? [1]

Longe de haver um acordo sobre o caráter da vida, várias correntes debatiam-se entre si para definir o fenômeno vital. Duas maneiras de responder a esse questionamento tornaram-se conhecidas como materialismo e vitalismo e influenciaram o desenvolvimento da química e da biologia ao longo dos anos que se sucederam. Se por um lado o materialismo tinha como objetivo "explicar a vida sem recorrer à vida", o vitalismo defendia a perspectiva de que "a vida jamais poderia ser completamente explicada pelas leis da química e da física" [2].

Uma ideia inicial do vitalismo utilizada para designar uma entidade física que opera nos sistemas vivos, mas não opera em sistemas não vivos, ficou conhecida como força vital (*Lebenskraft* - "vitalidade" em alemão). Acreditava-se que apenas seres vivos poderiam produzir matéria orgânica. A força vital era vista como a força que atuava em oposição às forças químicas, sendo considerada responsável pela quebra de ligações que mantinham substâncias alimentares em conjunto, e pela formação de novas ligações para recriar tecidos animais, proporcionar crescimento e movimento [3].

A obtenção da ureia no início do século XIX, por meio da síntese de Wöhler, iniciou uma mudança de paradigmas no vitalismo e contribuiu definitivamente para a fundação da química orgânica [4]. Uma vez demostrado que moléculas orgânicas poderiam ser criadas artificialmente, foi admitido que a essência da força vital não estaria ao nível molecular. Ao contrário, passa-se a considerar que as propriedades vitais deveriam surgir em algum nível mais alto da estrutura biológica, como por exemplo, o modo pelo qual as moléculas orgânicas estavam organizadas dentro dos tecidos vivos. Em meados do século XIX duas estruturas, as células e o protoplasma, foram sugeridos como agentes vitais plausíveis.

Nessa época, as inovações em termos de microscopia permitiram evoluir da observação dos níveis dos tecidos para níveis celulares e subcelulares. Isso produziu dois avanços significativos: a teoria celular e o reconhecimento das leveduras como organismos vivos. Nessa nova perspectiva, o corpo não era mais uma máquina simples, mas uma coleção de pequeninas máquinas cada qual com uma função especializada. A ideia que emergiu destas

observações foi a de que componentes sólidos particulados das células possuíam o poder de alterar quimicamente as substâncias em contato com eles [5].

A teoria celular de Schwann [5] enfatizou a importância destas “partes sólidas” da célula, do núcleo e da membrana na geração e crescimento dos organismos. A ideia relacionada às bases físicas da vida passou, nesse momento histórico, pela existência de um protoplasma no qual todas as propriedades vitais são resultado de forças moleculares atuantes. A físico-química adquire um papel relevante na compreensão da fisiologia, embora os fenômenos vitais ainda não estivessem sendo explicados por uma base física, mas sim relocados para um nível subcelular.

Diversos processos conhecidos há muito tempo passam nesse momento do século XIX a terem suas bases moleculares investigadas. Tendo em vista a evolução do conhecimento em biologia e química orgânica, diversos cientistas sentem-se motivados a estudar as bases químicas dos fenômenos biológicos, o que resultaria no desenvolvimento da bioquímica.

Processos como digestão de alimentos por secreções estomacais, conversão de amido a açúcares pela saliva e extratos vegetais observados muito previamente, levaram o químico Jöns Jacob Berzelius a compor a ideia de força catalítica. Em todos esses processos estavam envolvidas substâncias que foram chamadas fermentos, denominação inicialmente utilizada por Pauster, em uma analogia entre as reações das quais essas substâncias participavam e o já conhecido processo de fermentação alcoólica. Berzelius sugere a ideia de que certas substâncias continham uma “força catalítica” que lhes permitia acelerar determinadas reações químicas. Em 1836, Berzelius cunhou o termo catálise (do grego *kata* + *lusis* = movimento para baixo + ruptura, dando a ideia de decomposição). A característica básica desta força catalítica era a de que esses agentes promoviam as reações químicas sem serem alterados por essas reações [6].

Louis Pauster já estudava o processo de fermentação alcoólica e decomposição orgânica devido à ação de organismos vivos. Pauster concluiu que no processo de transformação do açúcar em álcool por leveduras existia um composto responsável pela conversão que ele chamou de fermento. Contudo, Pauster postulou a ideia de que os fermentos seriam inseparáveis da estrutura das células vivas, estabelecendo o conceito de que a fermentação era uma propriedade intrínseca das células vivas. Na mesma época, o químico alemão Justus von Liebig gerou uma controvérsia com relação a natureza vital da fermentação. Para Liebig o papel da levedura era produzir substâncias químicas que levariam a fermentação [7].

O termo enzima foi utilizado pela primeira vez pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne em 1878. A denominação enzima deriva do grego *énsimo* (*én* = em e *simo* = fermento ou levedura) [8]. Para Kühne, reações enzimáticas eram simples mudanças químicas e poderiam ocorrer sem a presença de organismos vivos e mesmo fora destes organismos. Foi Eduard Buchner em 1897 que, por meio de seus estudos sobre fermentação, levou ao fim a controvérsia entre Pauster e Liebig. Buchner mostrou que a fermentação ocorria na ausência de células vivas, uma vez que extratos de levedura poderiam fermentar o açúcar até álcool e provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas das células vivas [8].

A ideia da natureza química das enzimas permite à enzimologia se desenvolver como uma ciência quantitativa ainda que intimamente relacionada à química orgânica e a bioquímica. Durante o século XX todo o conhecimento sobre as bases moleculares destas ciências foi expressivamente ampliado. Contudo, é interessante notar que ainda que diversos avanços tenham sido feitos nessa época, persistia em algum nível vestígios da ideia de que as enzimas possuíam a força vital do organismo do qual elas eram extraídas [9]. Em 1901, Joseph Kastle publicou na *Science* o trabalho intitulado *"On the Vital Activity of the Enzymes"* [10], no qual ele menciona que "as enzimas são ativas da mesma forma que elas retêm certa atividade vital das células vivas".

O papel das enzimas no metabolismo foi amplamente estudado nos anos seguintes. Detalhes moleculares, no que se refere à estrutura tridimensional e aos mecanismos de catálise foram elucidados e o conhecimento a respeito das bases químicas da vida foi ampliado.

1.1.2 A importância das enzimas para a vida

Uma das propriedades fundamentais para todos os organismos vivos é o processo do metabolismo, por meio do qual compostos orgânicos são sintetizados (anabolismo) e quebrados (catabolismo). Ainda que o metabolismo de uma célula seja um sistema extremamente complexo, é possível fragmentá-lo em subsistemas e rotas bioquímicas, os quais são compostos por reações individuais que transformam um composto em outro.

Reações metabólicas são reações químicas como outras quaisquer, nas quais há consumo de substrato e produto é formado. Cada reação caminha espontaneamente no sentido em que a variação de energia livre (ΔG) é negativa. Isto é formalizado na Equação 1 que

correlaciona a variação de energia livre no estado padrão (ΔG°) com a constante de equilíbrio da reação *K*, a constante dos gases *R* e a temperatura absoluta *T*.

$$\Delta G° = -RTlnK \qquad \text{Equação 1}$$

Ainda que ΔG determine o sentido global no qual uma reação se processa, a velocidade de uma reação depende da energia de ativação necessária para que a reação aconteça. Se a energia de ativação for muito grande, a reação ocorrerá lentamente ainda que ΔG seja favorável. Isso significa que existe um balanço em termos de termodinâmica e cinética para as reações metabólicas, assim como efetivamente, existe para qualquer outra reação química.

Contudo, deve-se considerar que quando tratamos de reações metabólicas, existe uma cinética necessária para manutenção da dinâmica do metabolismo e consequentemente do organismo, de forma que as reações precisam ocorrer em um tempo viável.

Um exemplo bastante ilustrativo deste fato é a reação de descarboxilação espontânea do ácido orótico. O tempo de meia vida desta reação em solução aquosa neutra na ausência de enzimas em temperatura ambiente é de 78 milhões de anos, isto significa muitas ordens de grandeza mais lenta do que seria útil em um processo biológico. No entanto, essa reação consiste no último passo na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, um metabólito celular essencial. Os organismos podem utilizar reações lentas como essa em seu metabolismo porque eles possuem catalisadores biológicos. Quando a enzima oritidina 5'-fosfato descarboxilase é usada, ela aumenta a velocidade da reação cerca de 10^{17} vezes, de forma que a meia vida da reação catalisada pela enzima é menor do que 1/40 de segundo [11]. As enzimas permitem que as reações ocorram no metabolismo celular, as quais, sem catálise, ocorreriam tão lentamente que não seriam viáveis.

Essa capacidade das enzimas em viabilizar reações metabólicas do ponto de vista termodinâmico e cinético, torna extremamente interessante o estudo das bases moleculares associadas às suas funções celulares. Compreender como isso ocorre nos permite entender melhor o metabolismo como um todo e, portanto, intervir, quando necessário, de maneira racional.

1.1.3 As bases moleculares da catálise enzimática

Um conceito chave para estender o conhecimento em nível molecular sobre a participação das enzimas nas reações químicas foi o reconhecimento de que as enzimas deveriam formar complexos com seus substratos antes da transformação química. Essa ideia inicialmente articulada por Emil Fischer ficou conhecida como modelo da chave e fechadura [12].

Fischer observou que a enzima invertase, a qual ele havia isolado a partir da levedura de cerveja, hidrolisava α-glicosídeos, mas não β-glicosídeos, enquanto que a enzima emulsina hidrolisava β-glicosídeos, mas não α-glicosídeos. Com base nesta observação, Fischer concluiu que a enzima e o glicosídeo deveriam encaixar-se um ao outro como chave e fechadura, a fim de exercer um efeito químico um sobre o outro. Fischer constatou que as enzimas são estéreo específicas, e mais que isso, ele introduziu uma interpretação da ação das enzimas, na qual um ajuste confortável e íntimo entre enzima e substrato é um requisito necessário para a catálise [12].

Este conceito sobre a formação obrigatória de um complexo enzima:substrato foi muito importante nos estudos do comportamento cinético, realizado por Adrian Brown [13]. Brown propôs que uma molécula de enzima se combina com uma molécula da substância reagente, formando um complexo por um intervalo de tempo, e subsequentemente esse complexo se decompõe em produto e enzima (Equação 2).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\leftrightarrow}} ES \overset{k_2}{\rightarrow} P + E \qquad \text{Equação 2}$$

E, *S*, *ES* e *P* simbolizam a enzima, o substrato, o complexo enzima-substrato e o produto, respectivamente. De acordo com esse modelo, quando a concentração de substrato for alta o suficiente para converter completamente a enzima na forma ES, a segunda etapa tornar-se-á limitante da velocidade da reação global, passando a ser independente, ou de ordem zero em relação à concentração do substrato. Assim, Brown descreveu o que é hoje chamado de cinética saturante, onde cada reação individual da reação enzimática pode ser descrita por uma constante de velocidade: k_1 e k_{-1} são as constantes de velocidades para a reação direta e a inversa da formação do complexo ES (a primeira reação), e k_2 é a constante de velocidade da decomposição de ES em P (a segunda reação). Nesse modelo, a ligação do

substrato é reversível, mas a liberação do produto não. Para manter a simplicidade matemática, foi considerado que produto não é novamente convertido em substrato [14].

1.1.3.1 O estado estacionário

A ideias de Brown foram retomadas no marcante trabalho de Leonor Michaelis e Maud Menten que introduziram a equação que levava o nome de ambos (Equação 3) em 1913 [15]. Neste trabalho, a cinética enzimática é modelada relacionando a taxa de reação ao: *i.* k_{cat}, constante de primeira ordem para o passo mais lento da reação, representando o número máximo de moléculas de substrato que podem ser consumidas por molécula de enzima por unidade de tempo, *ii.* K_m, a medida da habilidade da enzima em ligar substrato, *iii.* concentração de enzima ([E]), *iv.* concentração de substrato ([S]) e *v.*velocidade de reação (v).

$$\frac{v}{[E]} = \frac{k_{cat}[S]}{K_m + [S]} \qquad \text{Equação 3}$$

Michaelis e Menten postularam inicialmente que durante a reação, a enzima (E) e o seu substrato (S) se encontravam em equilíbrio com o complexo ES assumindo que $k_{-1} >> k_2$, ou seja, o passo inicial da formação de ES poderia ser tratado com um processo de equilíbrio [16]. Esse postulado frequentemente não está correto, considerando que certos complexos ES não se dissociam em E e S livres, e sim prosseguem para formar o produto [14]. Briggs e Haldane mostraram que não era necessário assumir que E e S estavam em equilíbrio termodinâmico com o complexo ES para derivar a equação 3 [17] . Eles aplicaram o postulado do estado-estacionário a este modelo de ação enzimático. Segundo esse postulado, sob condição fisiológica normal, na qual o substrato está em excesso em relação à enzima, a [ES] permanece praticamente constante até que o substrato seja praticamente todo consumido. Assim, a velocidade de síntese de ES deve se igualar a velocidade de seu consumo durante a reação. ES permanece em estado estacionário [17].

K_m, k_{cat} e k_{cat}/K_m (constante de especificidade que fornece uma medida da eficiência catalítica) permanecem como parâmetros padrão para a descrição das propriedades cinéticas de uma enzima. Isso porque a caracterização cinética do estado estacionário é muito importante para o entendimento do metabolismo, uma vez que fornece dados sobre as taxas de reações catalisadas por enzimas em condições que existem na célula [16]. Contudo, a cinética

no estado estacionário não permite determinar detalhes a respeito do mecanismo de reação sem ambiguidade, uma vez que ela não nos fornece muitas informações sobre a natureza do complexo ES. Medidas no estado estacionário são incapazes de revelar o número de intermediários em uma reação catalisada por uma enzima.

1.1.3.2 Enzimas não Michaelinas

A dependência das velocidades iniciais de reação com relação à concentração de substrato nem sempre segue a cinética de Michaelis-Menten. Por volta de 1977 mais de 800 enzimas já haviam sido reportadas como desvios da cinética Michaeliana. No lugar do comportamento de hipérbole previsto pela equação de Michaelis-Menten (Equação 3), algumas reações enzimáticas dão lugar a curvas do tipo sigmoides quando as velocidades iniciais são plotadas com relação a concentração de substrato [18]. Esse comportamento cooperativo é uma propriedade exclusiva de enzimas multiméricas que se ligam ao substrato em múltiplos sítios [19].

Um modelo de ligação cooperativa ocorre se a fração de sítios de ligação de uma macromolécula que está ocupado por um tipo específico de ligante é uma função não linear da concentração deste ligante. A cooperatividade pode ser positiva, se a complexação com o ligante aumentar a afinidade dos outros sítios da macromolécula, ou pode ser negativa, se a complexação com o ligante reduzir a afinidade do receptor, tornando a ligação de outro ligante menos favorável.

A fração de ocupação $\bar{Y}$ de uma macromolécula com um ligante é definida como na Equação 4.

$$\bar{Y} = \frac{[sítios\ ligados]}{[sítios\ ligados] + [sítios\ não\ ligados]} = \frac{[sítios\ ligados]}{[sítios\ totais]} \qquad \text{Equação 4}$$

A primeira descrição de cooperatividade para uma proteína com vários sítios foi desenvolvida por Archibald Vivian Hill. Por meio das observações da ligação do oxigênio a hemoglobina, Hill sugeriu uma equação para descrever quantitativamente o fenômeno da cooperatividade (Equação 5).

$$\bar{Y} = \frac{K.[X]^h}{1+K[X]^h} = \frac{[X]^h}{K_d+[X]^h} \qquad \text{Equação 5}$$

h é o coeficiente de Hill, *[X]* se refere à concentração de ligante, *K* é a constante de associação aparente, usada na forma original da equação e K_d é a constante de dissociação aparente (usada na forma moderna da equação). Se $h<1$, o sistema apresenta cooperatividade negativa, enquanto que a cooperatividade é positiva se $h>1$. O número total de sítios de ligação é um limite superior para *h* [18].

1.1.3.3 O estado pré-estacionário

Informações bastante relevantes a respeito do mecanismo de reação podem ser obtidas quando dados do estado estacionário são combinados com dados provenientes de experimentos no estado pré-estacionário. O estado pré-estacionário é caracterizado por ser o período imediatamente anterior ao estado estacionário. Estudos dos primeiros milissegundos após a enzima ter sido misturada ao substrato consistem na cinética do estado pré-estacionário. Essa cinética se refere à formação e consumo dos intermediários de enzima:substrato até que as suas concentrações do estado estacionário sejam atingidas [20].

Cinéticas no estado pré-estacionário são mais complexas do ponto de vista experimental, uma vez que requerem uma resolução temporal adequada, na ordem de milissegundos. Contudo, o resultado deste tipo de estudo fornece informações muito úteis no que se refere ao mecanismo de catálise.

A combinação de informações fornecidas por estudos no estado estacionário e no estado pré-estacionário podem contribuir muito na elucidação de mecanismos de reação, sobretudo em reações que envolvem mais de um substrato.

1.1.3.4 Mecanismos moleculares da catálise enzimática

O conceito original de Fischer de que enzima e substrato se ajustavam como chave e fechadura foi sendo modificado ao longo do século XX conforme novas informações estruturais foram sendo obtidas.

Desde 1926, quando o bioquímico americano James Sumner isolou e cristalizou a enzima urease, tornou-se conhecida a natureza proteica das enzimas [21], ainda que muitos cientistas na época não acreditassem que se tratava de fato de cristais de enzima. Deve-se ressaltar que no início dos anos 80, químicos descobriram que certas moléculas de RNA, chamadas ribozimas, também possuíam propriedades catalíticas [22].

Em 1930, Haldane modificou a teoria da chave e fechadura proposta por Fischer sugerindo que a chave não se encaixava perfeitamente a fechadura, mas exercia certa deformação sobre ela. Nesta perspectiva, a enzima distorce o substrato de tal forma que este se torna mais suscetível para reagir e, consequentemente, a reação é acelerada [23].

Em meados do século XX, Linus Pauling propôs a ideia de que a atividade catalítica enzimática resulta do fato da região ativa da enzima ser complementar não ao substrato em sua configuração normal, mas sim ao substrato em uma configuração tensionada, que corresponde ao complexo ativado para a reação catalisada pela enzima. A molécula de substrato é atraída para a enzima, e assume um estado tensionado causado por interações químicas. Assim a energia de ativação da reação é diminuída de tal modo que a reação segue com uma velocidade maior do que ocorreria na ausência da enzima [24]. A ideia pioneiramente sugerida por Pauling e posteriormente ampliada por Richard Wolfenden e Gustav Lienhard é a de que as enzimas afetam a catálise uma vez que elas permitem interações de estabilização no estado de transição que estão ausentes no estado fundamental [25].

Uma análise sob a perspectiva termodinâmica nos permite compreender melhor estas ideias. As mudanças de energia livre (ΔG) sofridas ao longo de uma reação são usualmente representadas usando um diagrama, como na Figura 1. A energia livre do sistema todo é mostrada na coordenada vertical, e o progresso da reação é mostrado no eixo horizontal. O pico na energia livre no centro da reação representa o estado de transição (*TS*) que é formado entre substrato (*S*) e produto (*P*). O estado de transição é usualmente altamente instável devido à sua elevada energia livre, mas ele deve ser formado para que a reação prossiga. A velocidade da reação depende da diferença na energia livre entre o substrato e o estado de transição, denominada de energia de ativação (E_A), como mostrado na Figura 1A. Todas as catálises, incluindo catálises enzimáticas, aceleram as reações por meio da redução da energia de ativação, como mostrado na Figura 1B. Contudo, enzimas são mais complexas do que catalisadores químicos, em parte porque elas têm que se complexar ao substrato antes da catálise, mas também porque reações catalisadas por enzimas podem frequentemente ser divididas em passos menores com intermediários estáveis ao longo da coordenada de reação, como mostrado na Figura 1C [14].

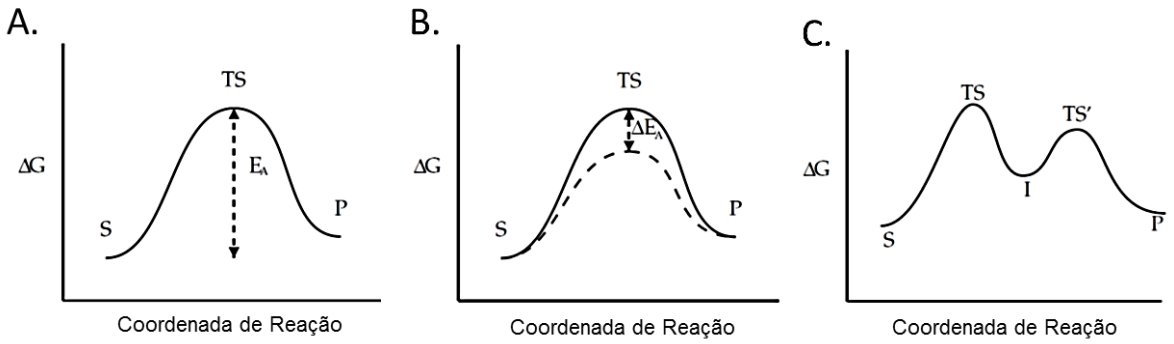

Figura 1. Diagrama de reação. A energia livre do sistema é mostrada na coordenada vertical, e o progresso da reação é mostrado no eixo horizontal. A. Energia Livre para uma reação não catalisada. B. Perfil de energia livre para uma reação catalisada. C. Perfil de energia livre para uma reação catalisada por enzima, com um intermediário. O pico na energia livre no centro da reação representa o estado de transição (*TS*) que é formado entre substrato (*S*) e produto (*P*). A velocidade da reação depende da diferença na energia livre entre o substrato e o estado de transição (*EA*). Modificado de [26].

Ao longo da segunda metade do século XX, a teoria da estabilização do estado de transição foi desenvolvida para tentar explicar completamente os aumentos extraordinários nas velocidades das reações catalisadas pelas enzimas. Contudo, novas ideias foram adicionadas. Já era conhecido então o fato de que a ligação do substrato à enzima resultava na distorção do substrato para a conformação do estado de transição. Novas teorias começaram a propor que a enzima também sofria mudanças conformacionais para ajustar o substrato ao sítio ativo. Assim, a ideia de que o sitio ativo consistia em uma estrutura rígida e similar a uma fechadura, começou a ser modificada [16].

A compreensão das bases moleculares pelas quais as enzimas afetam a catálise foi de extrema importância no desenvolvimento da bioquímica. A teoria que explica que as enzimas se ligam aos estados de transição com maior afinidade do que aos substratos forneceu as bases racionais do planejamento de fármacos fundamentados na compreensão dos mecanismos de reação específicos de enzimas [14].

Essa nova perspectiva de estudo na bioquímica, levando em conta mudanças conformacionais, pequenas e grandes, e a maneira pela qual elas interferem na catálise, permitiu ampliar o que era conhecido a respeito das bases moleculares da atividade enzimática. O desenvolvimento da biologia estrutural na década de 50, quando as estruturas cristalinas de proteínas começaram a ser solucionadas utilizando a cristalografia de raios X, permitiu a obtenção de novas informações e muitas enzimas foram mostradas como sofrendo mudanças conformacionais induzidas pela ligação ao substrato. Nesse momento, a biologia estrutural e os estudos de mecanismos de reação começam a compor juntos diversos estudos a respeitos de proteínas variadas, o que permitiu estender nossa compreensão a respeito de

comportamentos enzimáticos gerais e rotas bioquímicas essenciais para a vida em diferentes organismos.

1.1.3.5 A ideia de flexibilidade

A primeira ideia que considerava a flexibilidade da enzima como um ponto importante na catálise foi proposta por Daniel Koshland, um bioquímico americano. Koshland observou que alguns eventos não eram completamente explicados pelo conceito da chave-fechadura elaborado por Fischer [27].

O primeiro questionamento de Koshland foi sobre o papel da água nas reações biológicas. Ele considerou como modelo neste raciocínio a hexoquinase, uma enzima que catalisa a fosforilação da glicose formando a glicose 6-fosfato. O grupamento OH da água é um nucleófilo, assim como o grupamento OH do açúcar. Se a glicose se ligasse fortemente ao sítio ativo na enzima, segundo o conceito de chave-fechadura, ela poderia excluir as moléculas de água. Contudo, em diversas condições fisiológicas, quando a concentração de glicose poderia estar em níveis bem baixos, a água, a 55 M, poderia também preencher o sítio ativo vazio, segundo a mesma ideia da chave-fechadura, e assim competir com a glicose pelo ataque nucleofílico.

Outra observação de Koshland foi sobre as moléculas que tinham ação inibitória frente determinada enzima, mas que não se ligavam ao sítio ativo, os chamados inibidores não competitivos. O modelo da chave-fechadura não explicava de que forma moléculas que não se ligavam ao sítio ativo poderiam intervir na complexação do substrato ao mesmo.

A terceira observação que motivou Koshland foi em relação aos compostos que se ligam ao sítio ativo, mas não eram substratos, ou seja, os inibidores competitivos. Da mesma forma, o modelo da chave-fechadura não explicava como moléculas que se ajustavam bem ao sítio ativo poderiam não se comportar como substrato.

Baseado nestas observações, Koshland propôs o modelo do ajuste induzido para a complexação do substrato ao sítio ativo, seguindo três ideias básicas: *i.* A ação da enzima requer a orientação precisa dos grupos catalíticos; *ii.* O substrato causa uma mudança na relação tridimensional dos aminoácidos no sítio ativo; *iii.* As mudanças na estrutura da proteína causadas pelo substrato trarão os grupos catalíticos para um alinhamento adequado, enquanto os não substratos não o farão [27].

A teoria de Emil Fischer estava amplamente difundida entre os cientistas nessa época, de forma que houve certa resistência ao modelo do ajuste induzido. Contudo, de acordo com

o próprio Koshland, o ajuste induzido inclui a ideia do encaixe proposta por Fischer e apenas adiciona o conceito de flexibilidade. O conceito de flexibilidade permite compreender questões relativas à regulação enzimática, ao fenômeno da cooperatividade e da especificidade.

A questão que surgiu neste momento foi a respeito do quão amplo seriam estas mudanças conformacionais para serem consideradas relevantes em termos estruturais. Segundo o próprio Koshland, os grandes movimentos eram importantes, mas os pequenos movimentos também eram [27]. Uma característica importante do ajuste induzido é a de que o alinhamento dos grupos catalíticos e dos grupos de ligação devem ser otimizados para o estado de transição, e a realização desse estado é energeticamente desfavorável, sendo compensada pela energia da ligação ao substrato. Outra questão importante que surge com a ideia do ajuste induzido, é de que a conformação da proteína é selecionada ao longo da evolução para otimizar ambos: estado não ligado e estado ligado ao substrato.

Tanto o modelo da chave-fechadura quanto o modelo do ajuste induzido emergem da noção de que as proteínas existem em uma conformação única e dependente da sequência de resíduos de aminoácidos [28]. Essa noção estava contida na hipótese termodinâmica para o enovelamento de proteínas, proposta por Christian Anfinsen na década de 60, segundo a qual a estrutura nativa tridimensional era o estado termodinamicamente mais estável, ou seja, o de menos energia [29].

Contudo, o americano Cyrus Levinthal analisou o processo de enovelamento de proteínas também pelo aspecto cinético, ao considerar que a escala de tempo real envolvida no enovelamento deveria ser bastante pequena, para ser compatível com as necessidades dentro de uma célula. Levinthal questionou o fato de que segundo a hipótese termodinâmica, a busca pelo estado nativo era feita de maneira aleatória, por tentativa e erro. Considerando por exemplo uma proteína de 100 resíduos de aminoácidos contendo 99 ligações peptídicas, com 198 diferentes ângulos phi e psi, se cada um destes ângulos tivesse 3 possibilidades ou orientações favorecidas, a cadeia poderia assumir nessa busca, 3^{198} diferentes conformações em solução. Considerando ainda que a proteína não poderia passar de uma conformação para outra em menos de 1 ps, o processo do enovelamento seria inviável do ponto de vista cinético devido ao imenso tempo necessário para que todas as possibilidades fossem experimentadas. Nisso consiste o que foi chamado de “Paradoxo de Levinthal” [30].

A partir disso, Levinthal propôs a hipótese cinética como tentativa de explicar o processo. Ele sugeriu que a busca pelo estado nativo não envolve a exploração aleatória de todas as conformações possíveis para a cadeia polipeptídica, ao contrário, essa exploração

percorre antes um caminho de enovelamento (dito *folding pathway*) bem definido [31], composto por vários estados intermediários e no final do qual se encontra o estado nativo. Portanto, a rapidez extrema do processo de enovelamento é viabilizada pelo fato de haver um número limite de caminhos a serem percorridos.

Uma combinação das perspectivas termodinâmica e cinética tem sido atualmente aceita para explicar o processo de enovelamento de proteínas e tem sido também útil na compreensão dos eventos que envolvem complexação de proteínas e ligantes.

Essa perspectiva procura tratar a paisagem enérgica do processo de enovelamento usando a imagem de um funil. Resultados obtidos a partir de modelos de simulação computacional sugerem que inicialmente haveria uma superfície larga, representando o topo do funil, que reflete o conjunto de todas as conformações desnaturadas possíveis para uma proteína no início do processo. Essas conformações seriam as de maior energia livre, portanto de menor estabilidade. À medida que vamos percorrendo estes caminhos em direção ao vértice do funil, a energia das conformações vai diminuindo até atingir o mínimo global na conformação nativa e também o número de conformações é reduzido [32].

O conceito de paisagem energética e funil são importantes não apenas para compreender o processo de enovelamento de uma cadeia polipeptídica, mas também para entender mais sobre uma proteína já enovelada em termos dos eventos de reconhecimento e complexação molecular [28].

A ideia de paisagem de energia somada a uma variedade de resultados de experimentos utilizando técnicas que permitem monitorar movimentos em escalas de tempo variadas, como espectroscopia de fluorescência, ressonância magnética nuclear (RMN) e simulação de dinâmica molecular, levaram a ideia da presença de uma população de confôrmeros ao redor da base do funil de enovelamento, de forma que pudessem existir estados conformacionais de maior energia da proteína enovelada que fossem acessíveis. Segundo o modelo proposto para complexação de substrato, chamado de seleção de confôrmeros, estados conformacionais de alta energia da proteína podem ser selecionados pela complexação ao substrato [33].

Em geral, mudanças conformacionais e eventos de complexação e descomplexação de ligantes são processos ativados termicamente os quais requerem transpor barreiras de energia. Em processos ativados termicamente, o tempo necessário para transpor estas barreiras de energia, chamado tempo de transição, é significativamente menor do que o tempo de permanência em cada um dos estados [33].

Estudos estruturais de conformações de maior energia revelaram que mudanças conformacionais ativadas termicamente são comparáveis a mudanças conformacionais observadas durante a complexação e descomplexação de ligantes ou durante reações químicas catalisadas pelas enzimas, o que demostrou que estas mudanças conformacionais podem ocorrer na ausência do ligante ou substrato ou mesmo com ligantes já complexados.

A partir desta perspectiva, é possível analisar o modelo do ajuste induzido e da seleção de confôrmeros como dois lados da mesma moeda. Ajuste induzido e seleção de confôrmeros podem ser identificados pela ordem temporal do passo de complexação química e pela mudança conformacional física ao longo do caminho. Se por um lado para o ajuste induzido, a mudança conformacional ocorre após o passo de complexação, para a seleção de confômeros, a mudança conformacional ocorre antes do passo de complexação [33].

O estudo e compreensão destes fenômenos e o desenvolvimentos de ferramentas que permitam monitorar estes eventos são passos muito importantes para ampliarmos o conhecimento a respeito dos mecanismos de complexação entre enzimas, substratos e ligantes. Compreender estes mecanismos significa conseguir intervir de maneira mais eficiente, o que pode ser amplamente aplicado ao planejamento de moléculas com ação inibitória ou de ativação de diversos alvos enzimáticos.

Embora a mobilidade intrínseca das proteínas tenha sido por muito tempo desconsiderada no planejamento de fármacos, ainda que se soubesse da sua relevância para a compressão dos eventos complexação de ligantes, ela pode ser explorada e é provável que tenha um papel muito importante na compreensão e no planejamento de novas moléculas [34].

O processo no qual um fármaco interage com uma proteína alvo pode ser imaginado como uma colisão entre objetos flexíveis. O ligante colide com a superfície da proteína e desloca moléculas de água fracamente ligadas da sua superfície, mas não se difunde para longe imediatamente, como aconteceria em uma colisão elástica simples. Ao contrário, o ligante e a proteína rolam um sobre o outro e amostram áreas superficiais e espaço conformacional, com os substratos adequados sendo transportados para o sitio-ativo. Esse processo de correspondência ocorre entre vários confôrmeros da proteína e do ligante [34].

Assim, informações sobre o mecanismo de complexação enzima e substrato, tanto do ponto de vista estrutural quanto cinético, fornecem a base da compreensão do fenômeno que pode ser utilizada na otimização de modelos de busca de moléculas com atividade inibitória ou de ativação de alvos enzimáticos. Por outro lado, a determinação dos mecanismos de inibição ou ativação destes alvos, assim como a obtenção de detalhes estruturais da

complexação, fornecem evidências a respeito dos mecanismos pelos quais as enzimas exercem sua função. É nesse contexto de combinação de informações estruturais, de mecanismo e modulação funcional que se insere o trabalho desenvolvido ao longo desta tese.

1.2 Contexto bioquímico e detalhes estruturais das enzimas diidroorotato desidrogenases (DHODHs)

Inicaremos agora a apresentação de informações mais específicas com relação às enzimas DHODHs, que participam da biossíntese de nucleotídeos de pirimidina, especialmente no que se refere à enzima DHODH de *Leishmania major* (*Lm*DHODH), que foi utilizada como modelo neste estudo. O cenário bioquímico, os detalhes estruturais e do mecanismo, assim como as diferenças relevantes com relação à enzima humana serão discutidos. Por fim, será abordada a relevância das DHODHs como possíveis alvos terapêuticos na busca por agentes tripanocidas e leishmanicidas.

1.2.1 Quadro geral sobre o metabolismo de nucleotídeos

Nucleotídeos são um dos blocos que compõe as moléculas de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico) e obviamente, são moléculas vitais para a sobrevivência e para a proliferação das células. Como é conhecido, o metabolismo envolve um conjunto elaborado de rotas dinâmicas e interconectadas, onde diversos intermediários que contribuem consideravelmente para a composição do ambiente químico em uma célula são gerados por passos do anabolismo ou catabolismo celular. Existem importantes exemplos de intermediários que também efetuam um papel importante nos mecanismos de sinalização e regulação relacionados ao estado metabólico da célula. Estes intermediários não são inativos no contexto metabólico, ao contrário, eles participam no conjunto complexo e dinâmico do metabolismo [35].

Considerando a complexidade do metabolismo, é possível compreender a importância dos nucleotídeos não apenas como blocos constituintes das moléculas de ácidos nucléicos, mas também como moléculas indispensáveis para a vida, uma vez que realizam funções vitais para a célula. Por exemplo, AMP desempenha um papel fundamental na transformação de energia; cAMP e cGMP são importantes compostos que atuam como segundos mensageiros; ATP, ADP e AMP funcionam como reguladores alostéricos; formas ativadas de carboidratos e lipídios têm nucleotídeos de purinas e pirimidinas como precursores e nucleotídeos trifosfatos são precursores imediatos para macromoléculas de informação na célula [36].

Existem basicamente dois tipos de bases nitrogenadas que formam os nucleotídeos, chamadas de purinas e pirimidinas. Ambos, purina e pirimidina possuem um anel de 6-membros contendo dois nitrogênios e quatro carbonos, mas estas estruturas não têm correlação em termos de síntese. Em todos os organismos, podem ser encontradas diferentes rotas para biossíntese e degradação de purinas e pirimidinas.

De forma geral, nucleotídeos podem ser sintetizados em um organismo a partir de pequenos precursores, pela síntese *de novo*, e pela conversão de bases purínicas e pirimidínicas livres em nucleotídeos, através das vias de salvação. Durante o processo de catabolismo, purinas livres podem ser convertidas em ácido úrico e pirimidinas livres podem ser degradadas em compostos pequenos como β-aminoácidos [37].

Considerando este amplo quadro inicial a respeito do metabolismo de nucleotídeos, olharemos mais em detalhes para o metabolismo de nucleotídeos em *Leishmania*. A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados [38].

O ponto inicial é analisar as diferenças principais entre o metabolismo de nucleotídeos em *Leishmania* e em humanos.

Leishmania não possui maquinaria para síntese de nucleotídeos de purina a partir de percussores pequenos na síntese *de novo* e, portanto, depende inteiramente dos hospedeiros (insetos e mamíferos) para obter purinas sintetizadas. Isso obviamente faz com que a via de salvação de purinas seja crucial e consequentemente, repleta de alvos atrativos para o planejamento de fármacos [36]. Entretanto, ainda que a natureza obrigatória da via de salvação de purina torne esta uma rota crítica no metabolismo de *Leishmania*, nenhuma quimioterapia baseada em purina foi desenvolvida para parasitas cinetoplastídeos. Isso se deve ao fato de existir grande redundância nos transportadores de purinas, de forma que a inibição de um dos transportadores ou de uma enzima não apresenta efeito sobre a sobrevivência do parasito [39].

Por outro lado, *Leishmania* pode sintetizar pirimidina *de novo* e ainda expressa um conteúdo de enzimas da via de salvação [36]. Embora o metabolismo de pirimidinas em *Leishmania* tenha sido considerado menos suscetível a propostas terapêuticas do que a via de salvação de purinas, a organização do metabolismo de pirimidinas é bastante diversa em parasitas protozoários [39]. Algumas evidências têm indicado que a inibição seletiva de

enzimas da biossíntese de pirimidinas em protozoários pode ser uma boa ideia em termos de estratégia terapêutica.

1.2.2 Biossíntese de nucleotídeos de pirimidina em Leishmania e humanos: Algumas evidências relevantes

A primeira informação a ser considerada é a de que a demanda por pirimidina depende integralmente da atividade metabólica da célula como um todo, não sendo absolutamente um processo isolado. Por exemplo, muitos patógenos desenvolveram estratégias de redirecionamento do metabolismo de pirimidinas nos organismos nos quais eles infectam para garantir sua própria sobrevivência por meio da criação de ambientes nos quais eles possam encontrar níveis excelentes de metabolitos de pirimidina. Dessa forma, é imprescindível manter uma visão global da dinâmica e versatilidade da biossíntese de pirimidinas nas células [40].

Uma representação esquemática dos transportadores de pirimidina, biossíntese, via de salvação e caminhos de interconversão em Leishmania é mostrada adiante na Figura 2.

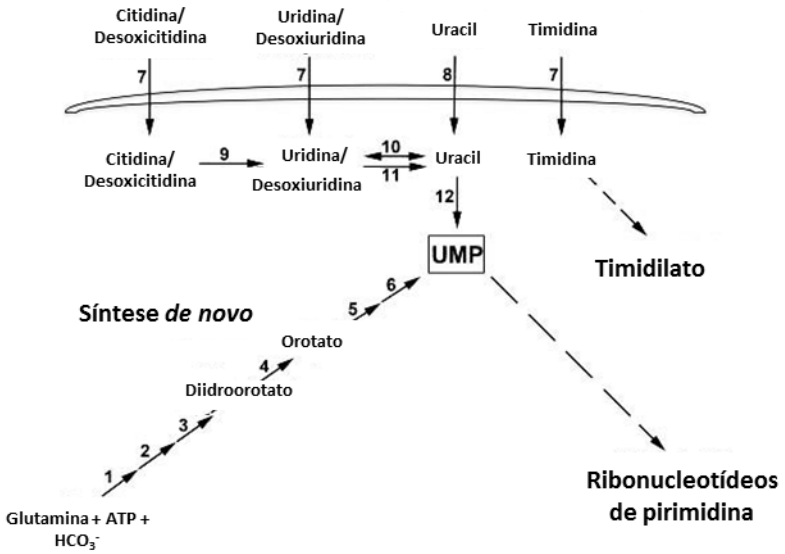

Figura 2. Representação esquemática do metabolismo em *Leishmania donovani*. A linha dupla curvada representa a membrana plasmática do parasita, enquanto as setas indicam a função bioquímica ou a atividade de transportador de: CPS (1), ACT (2), DHO (3), DHODH (4), UMPS (5 e 6), transportador de nucleosídeo 1 (7), transportador de uracil (8), citidina desanimase (9), uridina fosforilase (10), nucleosídeo hidrolase (11), e UPRT (12). Modificado de [40].

Embora as estruturas primárias das enzimas que compõem a via metabólica de biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina divirjam consideravelmente entre procariotos, protozoários, fungos e animais, a biossíntese *de novo* de pirimidinas representa um dos mais antigos processos metabólicos e todos os seus seis passos têm se mantido intactos durante a evolução [41].

Em ambos, *Leishmania* e humanos, seis enzimas estão envolvidas nesta rota e bicarbonato, glutamina e duas moléculas de ATP são utilizados como precursores. Estas seis enzimas conservadas em todas as espécies são: carbamoil fosfato sintetase (CPS), aspartato carbamoil transferase (ACT), diidroorotase (DHO), diidroorotato desidrogenase (DHODH), orotato fosforibosil trasferase (OPRT) e oridina monofosfato descarboxilase (OMPDC).

Ainda que, em termos gerais, ocorram similaridades na atividade das enzimas, são encontradas importantes diferenças entre as enzimas da biossíntese de pirimidinas de *Leishmania* e de humanos no que se refere especialmente à arquitetura dentro de polipeptídios multi-funcionais, regulação alostérica, uso de cofatores e localização celular. Como exemplo, temos o fato de que em humanos, um gene único codifica uma proteína multifuncional composta pelas primeiras três enzimas da via de biossíntese de pirimidina, essa proteína multifuncional é chamada CAD (CPS-ACT-DHO), por outro lado em *Leishmania*, estas enzimas são codificadas por genes separados [36].

De maneira mais geral, uma estratégia típica para desenvolvimento de drogas é buscar a inibição de enzimas que sejam essenciais para a viabilidade do organismo. Baseado nessa proposta, um estudo foi realizado para avaliar as contribuições da biossíntese e via de salvação de pirimidina em *Leishmania* nas formas promastigota e amastigota. Foram construídas linhagens individuais de mutantes deficientes em CPS (carbamoil fosfatosintetase), a primeira enzima da via *de novo*, UPRT (uracil fosforibosiltransferase), uma enzima da via de salvação, e em ambas CPS e UPRT ao mesmo tempo.

O mutante Δ*cps* confere auxotrofia para pirimidina, mas os parasitas Δ*cps* continuam robustos na habilidade para infectar ratos, indicando que a forma amastigota de *Leishmania donovani* dentro de macrófagos, tem acesso ao estoque de pirimidinas. O mutante Δ*uprt* não pode obter pirimidinas a partir do hospedeiro, mas manteve-se prototrófico para pirimidinas. E finalmente, para o mutante Δ*cps*/Δ*uprt* a linhagem foi bastante enfraquecida de forma que não houve persistência dos parasitas após quatro semanas de infecção. Baseado nestes achados, os autores concluíram que tanto a biossíntese *de novo* quanto a via de salvação contribuem para uma infecção robusta pela forma amastigota de *L. donovani* e uma estratégia terapêutica eficiente seria inibir ambas as vias [42].

Outras evidências a respeito da importância da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina foram encontradas em outros tripanosomatídeos. Uma linhagem mutante deficiente em CPS também foi construída para *T. cruzi* mostrando que a ausência do gene CPS reduz o crescimento do parasito e em particular, o crescimento da forma amastigota foi suprimido [43].

Dois outros estudos investigaram também a importância da biossíntese de novo de nucleotídeos de pirimidina utilizando especificamente a enzima DHODH que catalisa a quarta reação nesta rota. No primeiro estudo, o silenciamento gênico por interferência de RNA para enzima DHODH em *T. brucei* somente afetou o crescimento em um meio empobrecido de pirimidina ou na presença de um antagonista da recaptação de pirimidina [44]. No segundo estudo, os autores sugeriram que *T.cruzi* nocaute para DHODH não sobrevive mesmo na presença de nucleotídeos de pirimidina [45]. Estes dois estudos demonstram a importância da via de biossíntese de pirimidina e também sugerem a enzima DHODH com um alvo terapêutico atrativo para o planejamento de moléculas com atividade tripanocida.

Provavelmente devido às similaridades em termos da atividade enzimática para as enzimas da via *de novo* de pirimidinas em *Leishmania* e humanos, nenhum fármaco para tratamento de Leishmaniose tem como alvo uma enzima desta rota. Contudo, algumas propriedades exclusivas da enzima DHODH fazem com que ela seja um alvo bastante promissor. Algumas características exclusivas a cada enzima já puderam ser identificados apenas pela análise da sequência primária das proteínas, como a localização celular, o uso de diferentes substratos e o mecanismo de catálise adotado dependente de diferentes resíduos. O desenvolvimento desse projeto com os estudos de caracterização e busca de inibidores para a enzima DHODH de *Leishmania major* também teve importante papel no sentido de obtermos detalhamentos acerca da distinção entre as enzimas humana e do parasito.

1.2.3 Diidroorotato desidrogenase (DHODH): uma Flavoproteína

1.2.3.1 Ciclo catalítico dependente de flavina mononucleotídeo (FMN)

Como mencionado, a biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina é uma importante via metabólica, altamente conservada em eucariotos e procariotos. No quarto passo desta via metabólica, atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), responsável pela conversão da molécula L-diidroorotato (DHO) em orotato. Essa reação corresponde à única etapa de oxidação-redução na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina [46].

O ciclo catalítico nas DHODHs é dependente do grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN) (Figura 3), de forma que as DHODHs são classificadas como flavoenzimas. Esse cofator essencial para flavoproteínas é derivado da riboflavina e está amplamente distribuído na natureza. A porção relevante em termos mecanísticos no FMN é o sistema anelar da isoaloxazina que serve como catalisador de oxidoredução reversível em muitos processos biológicos. É tambem este componente estrutural responsável pela absorção da luz na região do ultravioleta e do visível que confere coloração amarela às flavoproteínas. Na forma oxidada (Figura 3A) a flavina apresenta dois picos característicos de absorção, o primeiro ao redor de 360 nm e o segundo ao redor de 450 nm (Figura 3C), sendo que estes picos são perdidos quando a flavina é reduzida (Figura 3B e 3C) [47].

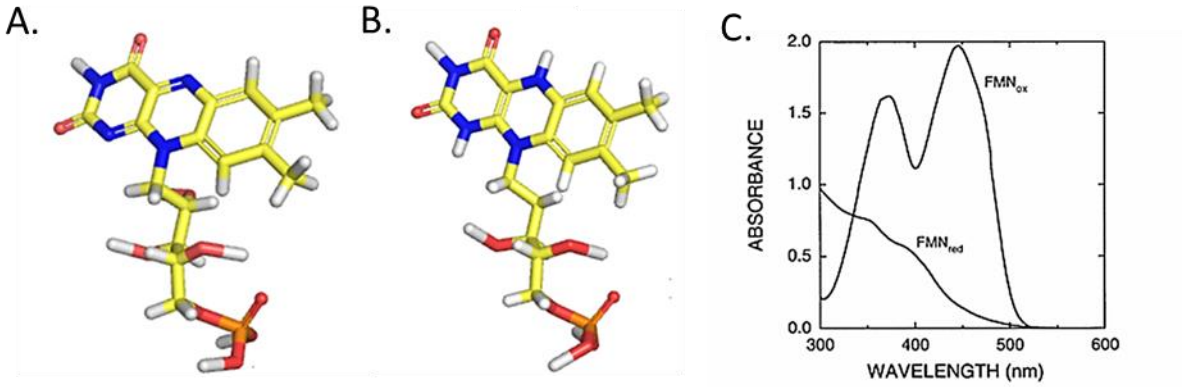

Figura 3. Flavina mononucleotídeo (FMN) nas formas oxidada (A) e reduzida (B). Em C é possível observar o espectro de varredura para FMN e FMN reduzido. A flavina oxidada apresenta dois picos característicos de absorção (~ 360 nm e ~ 450 nm), sendo que estes picos são perdidos quando a flavina é reduzida.

O espectro de absorção do FMN complexado é uma característica particular de cada proteína, uma vez que depende do ambiente químico formado pelos resíduos de aminoácidos do sítio envolvido na complexação da flavina. O FMN é, em geral, fortemente complexado à estrutura proteica, ainda que essa complexação seja não covalente na maioria dos casos. Isso faz com que, salvo em exceções, não ocorra dissocição entre o FMN e a proteína. Essa forte complexação provavelmente evoluiu do fato do FMN ser rapidamente auto-oxidado fora dos microambientes dos sítios ativos das enzimas [48].

As flavoenzimas operam em cada ciclo catalítico por meio de duas reações parciais. Na primeira reação o substrato é oxidado enquanto a flavina complexada é reduzida, essa primeira parte é, em geral, chamada de reação parcial de redução. Em um segundo momento, a flavina reduzida é reoxidada, e esta etapa é chamada de reação parcial de reoxidação. As flavinas atuam verdadeiramente como grupos prostéticos e não como co-substratos e não aparecem na estequiometria da reação [48].

Uma característica importante é a de que durante esse processo redox, um ou dois elétrons são cinética e termodinamicamente acessíveis levando a estados de oxidação distintos. A redução pela transferência de um elétron leva ao estado de semiquinona e por dois elétrons leva ao estado de flavina reduzida, sendo ambos biologicamente relevantes dependendo do mecanismo pelo qual ocorre a transferência eletrônica [48]. Uma característica muito importante das flavoproteínas refere-se ao fato de que é possível monitorar a formação destes estados de oxidação distintos por meio do monitoramento do espectro de absorção na região do visível em determinada resolução temporal, o que permite obter uma ampla quantidade de informação a respeito dos mecanismos envolvidos na catálise.

Especificamente para as DHODHs, durante a catálise, a enzima utiliza a flavina mononucleotídeo como cofator, para, na primeira etapa da reação, promover a oxidação do substrato L-diidroorotato (DHO) enquanto FMN é reduzido. Na segunda etapa da reação, FMN é reoxidado ($FMNH_2$ convertido em FMN) através do auxílio de um segundo substrato, o agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas de diferentes origens biológicas. Para a enzima DHODH de tripanossomatídeos como *Leishmania major* (*Lm*DHODH) e *Trypanosoma cruzi* (*Tc*DHODH), fumarato é o agente oxidante (Figura 4), enquanto para a enzima humana, ubiquinona é o agente oxidante [49] .

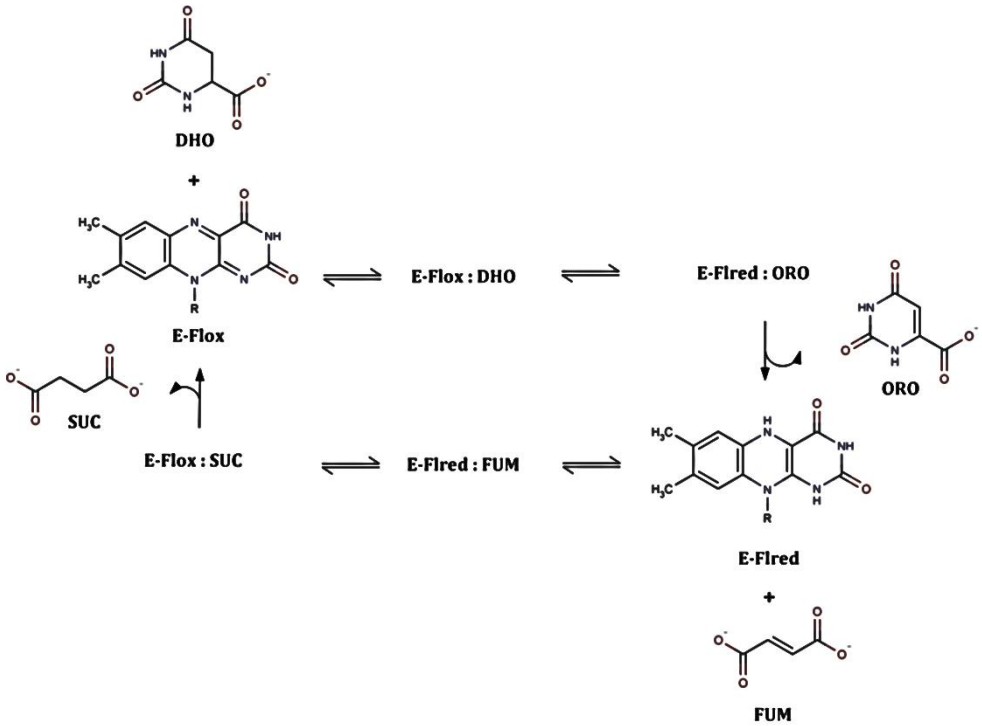

Figura 4. Quandro geral da reação catalisada pela *Lm*DHODH. Nesse processo a enzima complexada ao FMN em sua forma oxidada (E-Flox) é reduzida pelo primeiro substrato, diidroorotato (DHO). O produto da primeira reação, orotato (ORO), é liberado antes que o segundo substrato se ligue ao sítio ativo. Na segunda etapa da reação, a enzima complexada ao FMN reduzido (E-Flred) é reoxidada pelo fumarato (FUM) e o segundo produto, succinato (SUC), é liberado [50].

1.2.3.2 Classes de DHODHs

De acordo com as características estruturais e de localização celular, as enzimas DHODHs são atualmente divididas em duas classes 1 e 2, sendo que as enzimas da família 1 são ainda subdivididas em subclasses 1A e 1B.

DHODHs de classe 1 são proteínas citosólicas que utilizam pequenas moléculas, fumarato ou NAD^+, como agentes oxidantes no ciclo catalítico. Enzimas desta classe são encontradas, em bactérias do tipo Gram-positivas, fungos anaeróbicos e em eucariotos inferiores, como no caso dos tripanosomatídeos *Leishmania major* [44, 51-56]. Membros da subclasse 1A, como a *Lm*DHODH, apresentam-se como dímeros compostos por duas cópias da cadeia polipeptídica codificada pelo gene *PyrD*, enquanto que os membros da subclasse 1B são tetrâmeros, formados como um dímero de heterodímeros, compostos de duas cadeias polipeptídicas codificadas pelos genes *PyrD* e *PyrK*.

As enzimas da classe 2 são monoméricas, codificadas pelo gene *PyrD* e caracterizadas por apresentarem uma extensão na região N-terminal, denominada domínio de membrana (Figura 5A), que permite a interação destas enzimas com a membrana com a membrana interna da mitocôndria em eucariotos [57-59] ou membrana citosólica de alguns procariotos como *Escherichia coli* [60-62]. As enzimas desta classe utilizam como receptores de elétrons, moléculas de caráter hidrofóbico. No caso da enzima humana, pertencente à família 2, ubiquinona é o agente oxidante.

A identidade sequencial entre membros das classes 1 e 2 é de aproximadamente 20%. Membros da classe 2 compartilham a identidade sequencial em torno de 40%, sendo que as maiores diferenças são encontradas ao longo das duas α-hélices que formam o domínio de membrana. A identidade sequencial entre membros da classe 1 é maior que 50%, chegando a mais que 70% quando analisamos apenas as DHODHs de tripanossomatídeos. As DHODHs das diferentes espécies do gênero *Leishmania* compartilham identidade sequencial superior a 85%.

Atualmente, podemos encontrar no banco de dados Protein Data Bank (PDB) a estrutura tridimensional resolvida para enzimas DHODHs pertencentes às duas classes, conforme resumido na Tabela 1. Em particular, as estruturas cristalográficas das enzimas DHODHs de *Leishmania major* (*Lm*DHODH), *Trypanosoma cruzi* cepa Y (*Tc*DHODH-Y) e *Leishmania braziliensis* (*Lb*DHODH) foram resolvidas em nosso laboratório.

Tabela 1: Relação das estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados PDB das enzimas DHODH das diferentes classes, especificando as diferenças relacionadas às características estruturais, natureza do agente oxidante e cofator utilizado pela enzima de cada organismo.

Classe DHODH	Organismo	Cofator	Agente oxidante	Estado oligomérico	Código PDB
1A	*Trypanosoma cruzi* - cepa Y	FMN	Fumarato	Homodímero	3C3N [56]
	Trypanosoma cruzi - cepa Tulahuen (gene2)				2DJX* [63]
	Trypanosoma brucei				2B4G [44]
	Leishmania major				3GYE* [54]
	Leishmania donovani				3C61 [†]
	Leishmania braziliensis				4WZH [64]
	Lactococcus lactis				1DOR* [65]
	Streptococcus mutans				3OIX [66]
1B	*Lactococcus lactis*	FAD FMN [2Fe-2S]	NAD^+	Heterodímero	1EP1* [67]
	*Ther*motoga *maritima*				4YLF* [68]
2	*Homo sapiens*	FMN	Ubiquinona	Monômero	1D3G* [57]
	Plasmodium falciparum				1TV5* [69]
	Rattus Rattus				1UUM* [70]
	Rattus norvegicus				4ORI [71]
	Escherichia coli				1F76 [72]
	Mycobacterium Tuberculosis				4XQ6 [†]

*Há mais de uma estrutura depositada no PDB relacionada à DHODH deste organismo. [†] Dados não publicados.

Do ponto de vista estrutural, ambas as classes se enovelam em um motivo barril α/β (domínio catalítico) que consiste de uma região central formada por oito fitas beta paralelas rodeadas por oito α-hélices. No topo do barril, três fitas β antiparalelas formam uma tampa

que cobre o sítio redox. O fundo do barril é formado um par de fitas β antiparalelas. O sítio de ligação do orotato é localizado na parte superior do barril onde várias fitas formam o bolso de ligação do substrato e do FMN [65] (Figura 5).

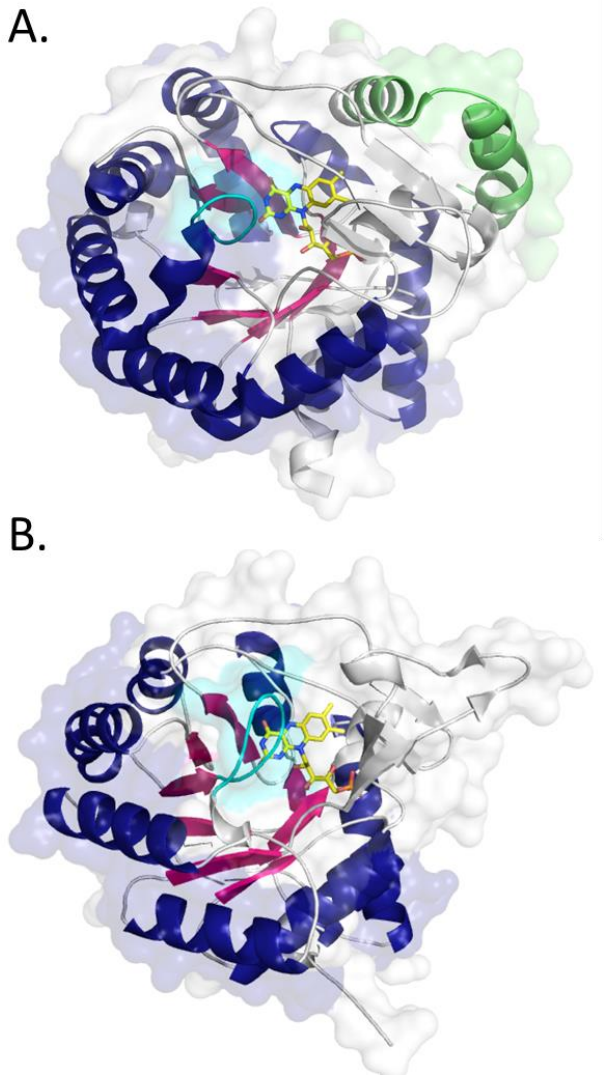

Figura 5. Representação em *cartoon* dos monômeros da (A) *Hs*DHODH – DHODH classe 2 e (B) *Lm*DHODH – DHODH classe 1A. (PDB ID: 2BOM e 3TQ0, respectivamente). Em ambos os casos o sítio ativo é localizado no topo do barril α/β, e contém uma molécula de FMN. A entrada do sítio ativo é protegida por um *loop* catalítico, representado em ciano. Na *Hs*DHODH em A, é possível observar na região N-terminal o domínio de membrana, colorido em verde.

A entrada do sítio catalítico é protegida por um *loop* com grande flexibilidade. Tem sido reportado que este *loop* varia entre uma conformação aberta e uma conformação fechada durante a catálise para as enzimas de classe 1A. Nestas enzimas da classe 1A, o *loop* catalítico

é maior e mais flexível (Figura 5), e sabe-se que a movimentação deste *loop* exerce um papel importante na catálise.

Embora a estrutura em barril α/β de membros da família 2 se assemelhe com a estrutura da DHODH de membros da família 1, há algumas diferenças no sítio ativo. Uma grande diferença encontrada entre os membros da famía 1 e 2 das DHODHs é com relação ao resíduo que atua como base catalítica na primeira etapa da reação, responsável pela subtração do hidrogênio do carbono C5 da molécula L-diidroorotato, onde a cisteína catalítica da classe 1A das DHODHs é substituída por uma serina na classe 2 [72]. (Figura 6).

Além disso, duas outras importantes mutações são observadas quando comparamos a região do sítio ativo entre as classes 1A e 2, incluindo o resíduo de serina (Ser196) em *Lm*DHODH que é substituído por uma treonina (Thr285) na enzima humana, e o resíduo de leucina (Leu72) em *Lm*DHODH) que é substituído por um resíduo de fenilalanina (Phe149). Estas análises, nos sugerem que embora o modo de atuação das enzimas das famílias 1 e 2 das DHODHs seja semelhante, diferenças químicas, estruturais e dinâmicas podem ser exploradas para introduzir seletividade aos inibidores da classe 1A (Figura 6).

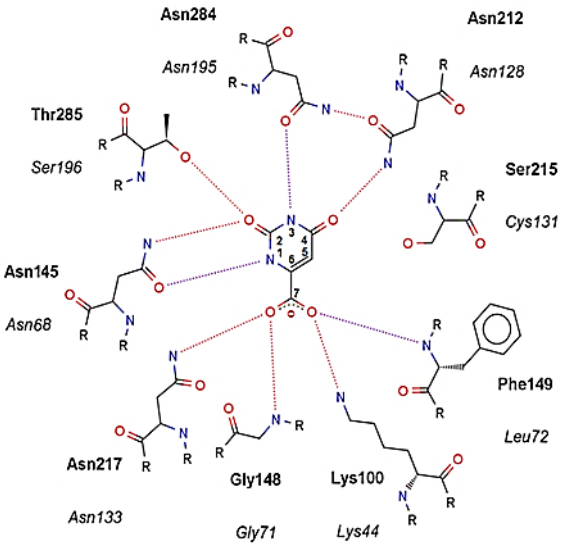

Figura 6. Interações entre DHODH e o produto da reação, ORO. Resíduos presentes na enzima humana estão representados em fonte negrito e da enzima *Lm*DHODH em fonte itálico. Modelo baseado nas estruturas tridimensionais das enzimas complexadas com o produto da catálise, PDB ID: 2FPV (humana) e 3GZ3 (*L. major*). Figura adaptada de [73].

1.2.3.3 DHODHs de Classe 1A: detalhes estruturais e de mecanismo

Um aspecto muito importante das enzimas de classe 1A consiste no fato de que ambos os substratos, DHO e fumarato, ocupam o mesmo sítio, o sítio pirimidínico. Por outro lado,

para as enzimas da classe 2, o DHO interage no sítio pirimidínico, enquanto a ligação do segundo substrato, a quinona, é proposto como sendo na região entre as hélices do domínio de membrana, um sítio de caráter hidrofóbico [74]. Essa diferença tem muita relevância em termos do mecanismo das reações para estas enzimas, o que será discutido com base nos resultados apresentados nesta tese.

Estudo utilizando a enzima de *Lactococcus lactus* como modelo demonstrou que a forma dimérica é essencial para a atividade catalítica das enzimas da classe 1A das DHODHs [75]. A enzima *Lm*DHODH é dimérica, enquanto a enzima humana (classe 2) é monomérica [65]. Como consequência, a interface do dímero é uma região exclusiva na enzima do parasito [56].

Além do estado oligomérico dimérico, tem sido proposto para enzimas da classe 1A, um modelo de reatividade que envolve o funcionamento de um monômero por vez, refletindo uma assimetria no comportamento catalítico dos monômeros que compõem o dímero [76].

De forma geral, a análise topológica nos permite identificar cinco regiões independentes nas DHODHs da subclasse 1A que apresentam forma, volume e localização definidos e que são relevantes, do ponto de vista estrutural. Nomeadas de acordo com a distância do sítio ativo, estas regiões compreendem: o sítio ativo (S1), uma extensão da região S1 (S2), a região atrás do *loop* catalítico (S3), uma extensão da região S3 (S4) e a região localizada na interface dimérica (S5) (Figura 7).

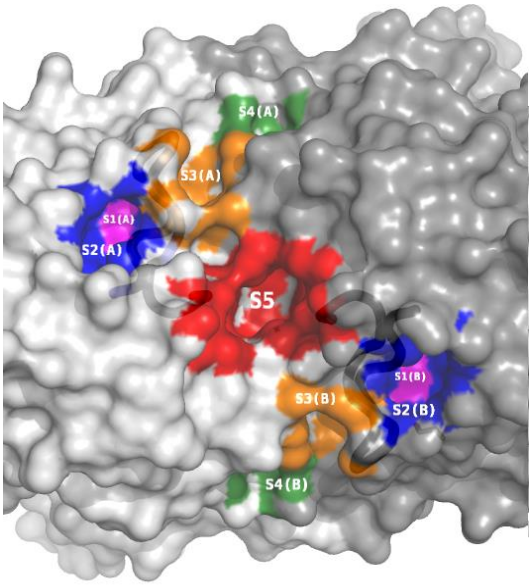

Figura 7. Regiões independentes na DHODH classe 1A, em destaque no dímero. O sítio ativo (S1), uma extensão da região S1 (S2), a região atrás do *loop* catalítico (S3), uma extensão da região S3 (S4) e a região localizada na interface dimérica (S5) estão indicadas em rosa, azul, laranja, verde e vermelho, respectivamente [73].

Para *Lm*DHODH, a abertura do *loop* catalítico permite a abertura de um canal de acesso ao sitio ativo envolvendo os sítios S2 e S3-S4, o que possibilitaria a acomodação de moléculas maiores. Uma vez que estes sítios ao redor do *loop* catalítico apresentam diferenças significativas entre as DHODHs de diferentes classes, ligantes poderiam ser planejados para ocuparem estas regiões. Desta forma, estes sítios mais distantes do sítio ativo podem ser validados como possíveis bolsões a serem explorados nas estratégias de inibição e busca de seletividade.

1.3 Planejamento de inibidores para as enzimas DHODHs de tripanosomatídeos

1.3.1 Motivação

As leishmanioses estão inseridas em um quadro bastante complexo das doenças infecciosas parasitárias, frequentemente chamadas de doenças negligenciadas. Estas doenças afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões geográficas mais pobres do planeta e são responsáveis por incapacitar anualmente uma fração significativa da população, o que continua sendo um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dos países mais pobres [77]. Mais do que doenças negligenciadas, tratam-se de pacientes negligenciados para os quais a realidade é bastante cruel [78].

Especificamente a Leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, que acomete pele e mucosas. A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados [38].

As leishmanioses representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Aproximadamente vinte e uma espécies são responsáveis pelas diferentes patogenias de leishmaniose. Leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, que provoca ulcerações na pele deixando cicatrizes permanentes; leishmaniose muco-cutânea (LMC) causa úlceras na pele levando a destruição das membranas mucosas do nariz, boca e garganta; leishmaniose cutânea difusa (LCD), a forma mais difícil de tratar, causa lesões crônicas parecidas com a lepra, que não cicatrizam espontaneamente e voltam após tratamento; e leishmaniose visceral (LV), também chamada

calazar, é a forma mais preocupante da doença, sendo fatal se não tratada, causa hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia e perda de peso [79]. Espécies diferentes de *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes formas clínicas da doença. Infecções por *L. major* ou *L. tropica* causam LC, as espécies da América do Sul, como *L. braziliensis*, causam LMC e *L. donovani* ou *L. infantum* causam LV. Deve-se destacar que mesmo com a diversidade de espécies de *Leishmania*, a manifestação clínica da doença depende não apenas da espécie envolvida, mas também do estado imunológico do indivíduo infectado. Um espectro de formas clínicas pode se desenvolver na dependência das características da resposta imune mediada por células [38].

Uma questão que deve ser analisada é a alteração no padrão de transmissão das Leishmanioses nas últimas décadas. Inicialmente considerada como zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas, a doença começou a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Atividades como exploração desordenada da floresta, derrubada de matas para construção de estradas e extração de madeira tornam o quadro de transmissão ainda mais diverso e de difícil contenção [38].

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano [38]. Especificamente no Brasil, o quadro é bastante complexo. O país lidera as estatísticas com relação à ocorrência das diferentes formas de leishmanioses na América Latina e Caribe e isso reflete a extrema desigualdade existente em nosso país [80]. Nos dados mais recentes divulgados pela OMS, que se referem ao ano de 2013, o número de casos reportados para o Brasil é de 3253 para LV e 18226 para LC [81]. Estes dados refletem o fato de que no Brasil, a Leishmaniose é uma doença com ampla diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores, e apresenta padrões de transmissão complexos e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle [38].

1.3.2 A necessidade de novos fármacos para o tratamento das Leishmanioses

Segundo a OMS e o Ministério da Saúde, as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como N-metilglucamina e estibogluconato de sódio, sendo que este último não é comercializado no Brasil. Estas drogas são consideradas leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos são inibidos, sendo esta

inibição acompanhada de redução na produção de ATP e GTP [38]. Contudo, os mecanismos moleculares envolvidos nesta inibição não são completamente elucidados. Ainda que estes fármacos tenham elevada eficácia, eles apresentam importantes efeitos adversos, dependendo da dose estabelecida. O principal efeito adverso do Sb^{5+} é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular, podendo causar arritmias cardíacas e/ou outras manifestações de cardiotoxicidade.

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina). A anfotericina B atua nas formas promastigotas *in vitro* e amastigotas *in vivo* de *Leishmania.* Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática de *Leishmania*. As pentamidinas sao diamidinas aromáticas, contudo poucos estudos foram realizados nas Américas utilizando esta terapêutica. Tanto a anfotericina B quanto as pentamedinas apresentam limitações, como necessidade de tratamentos prolongados, diversos efeitos colaterais e custos elevados [38].

Considerando o complexo quadro fisiopatológico das Leishmanioses, o número reduzido de boas alternativas terapêuticas e a relevância desta doença no cenário brasileiro, é evidente a necessidade de novos estudos que envolvam a busca por novos tratamentos.

1.3.3 As DHODHs de tripanosomatídeos como possíveis alvos terapêuticos

A enzima DHODH é um alvo importante no desenvolvimento de fármacos com atividade anti-inflamatória, imunosupressora, antiproliferativa e antiparasitária [82-86]. O potencial terapêutico da inibição desta via metabólica, através da inibição específica da enzima DHODH, tem sido demonstrado por compostos como a molécula A771726, metabólito ativo da Leflunomida (ARAVA®), aprovado para o tratamento de artrite reumática, que inibe a enzima DHODH humana [87]. O composto Brequinar, também inibidor da enzima DHODH humana, tem sido testado como antineoplasmático [88]. Já o composto Atavacona (Malarone®), inibidor da enzima DHODH de *Plasmodium falciparum* (*Pf*DHODH) é atualmente prescrito como medicamento anti-malária. Em todos estes exemplos, as DHODHs envolvidas são enzimas da classe 2 e os inibidores destas enzimas foram planejados para interagir no sítio da ubiquinona, na região do domínio de membrana, bloqueando o acesso do agente oxidande ao sítio ativo.

Contudo, este sítio está ausente nas enzimas da classe 1 (Figura 5) e inibidores conhecidos são seletivos para a classe 2 e não inibem as enzimas de tripanosomatídeos. No caso das DHODHs de classe 1A, como já foi dito, os dois substratos se ligam ao mesmo sítio, o chamado sítio pirimidínico.

O primeiro estudo tendo como alvo para inibição a enzima DHODH de classe 1A foi realizado com *Lactococcus lactis* (*Ll*DHODH-A) [89]. Neste trabalho, foram obtidos protótipos de inibidores, que embora não apresentassem excelente atividade inibitória, eram inibidores seletivos para a enzima de *Lactococcus lactis*, uma vez que não inibiam nem a enzima humana, nem a enzima de *E. coli*. Esta busca por inibidores demonstrou a possibilidade da obtenção de inibidores específicos frente às DHODHs de classe 1A interagindo com o sítio pirimidínico, apesar da elevada identidade sequencial mantida neste sítio para as DHODHs de ambas as classes.

Considerando a imensa necessidade de quimioterapias eficientes para as Leishmanioses, bem como a relevância da biossíntese de pirimidina e as peculiaridades das DHODH de tripanosomatideos, que podem ser exploradas em termos de estrutura e mecanismos, diversos esforços têm sido realizados em nosso laboratório na busca por agente inibidores das DHODHs de classe 1A. Ao longo destes anos, diversas abordagens foram utilizadas e alguns inibidores foram identificados [73] a partir da combinação de ferramentas variadas.

Considerando que não exista ainda nenhuma validação genética que confirme a essencialidade das DHODHs para o crescimento ou sobrevivência da *Leishmania*, métodos químicos podem ser uma abordagem alternativa. Validação química envolve o uso de um composto capaz de se ligar com alta afinidade ao alvo produzindo morte celular ou inibição do crescimento celular dependente da dose. Nesse contexto, compostos com atividade inibitória frente à *Lm*DHODH poderiam ser também utilizados como ferramentas em estudos envolvendo o alvo e a via bioquímica [90].

Tendo em vista esse contexto, podemos afirmar que as DHODHs de tripanosomatídeos são enzimas atrativas uma vez que participam de uma rota bioquímica importante, apresentam diferenças estruturais e relacionadas ao mecanismo quando comparamos à enzima humana e possuem diferentes bolsões que podem ser explorados no planejamento de moléculas com atividade inibitória.

CONCLUSÕES

5.0 Conclusões

No quarto passo da via de biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), responsável pela conversão da molécula L-diidroorotato (DHO) em orotato em um ciclo catalítico dependente do grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN). Especificamente para as DHODHs, durante a catálise, a enzima utiliza a flavina mononucleotídeo como cofator, para, na primeira etapa da reação, promover a oxidação do substrato L-diidroorotato (DHO) enquanto FMN é reduzido. Na segunda etapa da reação, FMN é reoxidado através do auxílio de um segundo substrato, o agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas de diferentes origens biológicas.

Considerando a relevância da rota bioquímica da qual participam as DHODHs e considerando as diferenças em termos estruturais e de mecanismo existentes entre a enzima humana e a enzima de tripanosomatídeos, nosso estudo centrou-se na obtenção do detalhamento em nível molecular envolvido na catálise enzimática promovida pela DHODH de *Leishmania major* e na busca por compostos com atividade inibitória frente a esta enzima.

No que se refere à elucidação do mecanismo catalítico, importantes contribuições resultaram do nosso estudo. Por meio da combinação dos resultados referentes ao estado pré-estacionário e estacionário, observamos que para a *Lm*DHODH a liberação do ORO é o passo crucial na determinação da velocidade limitante do ciclo catalítico, o que não ocorre para as DHODHs pertencentes à classe 2, para as quais a liberação do ORO foi descrita como sendo muito lenta e não competente na catálise [113].

Pela primeira vez, análises no estado estacionário para a *Lm*DHODH realizadas com amplo intervalo de variação na concentração dos substratos permitiram observar a cooperatividade positiva para a ligação de DHO com um valor de coeficiente de Hill próximo a 2 e sua modulação na presença de ORO. Também, foi demonstrado que essa cooperatividade está relacionada à comunicação cruzada entre as cadeias do dímero, sendo mediada pela interface dimérica. Nossos resultados fornecem novos dados para explicar o modo cooperativo na ligação do substrato como consequência do comportamento assimétrico de funcionamento dos sítios ativos nas duas subunidades para as DHODHs de classe 1A [76, 114].

Foram encontradas diferenças chave no mecanismo enzimático adotado pelas enzimas DHODHs de classe 1A e classe 2, que podem ser exploradas no desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos para a *Lm*DHODH.

É razoável considerar a hipótese de que o bloqueio da passagem da informação entre os monômeros por meio de alterações nas propriedades químicas e dinâmicas da interface dimérica, seja uma estratégia inovadora no planejamento de inibidores seletivos.

Outra abordagem nesse sentido seria o controle do movimento do *loop* catalítico. Baseado em evidências encontradas neste trabalho, pode-se afirmar que o mecanismo catalítico para as DHODHs de classe 1A envolve a dinâmica conformacional do *loop* catalítico e a comunicação entre os *loops* catalíticos dos monômeros via interface dimérica. Portanto, estratégias que mirem estes dois aspectos tendem a ser promissoras no que se refere à busca de moléculas com ação inibitória e seletivas para DHODHs de classe 1A.

Além disso, foi desenvolvido um ensaio para triagem de alto desempenho tendo como alvo a enzima *Lm*DHODH. Alguns compostos promissores foram obtidos e encontram-se agora em fase de aquisição para que experimentos de determinação do mecanismo de inibição e ensaios de co-cristalização sejam realizados.

Os detalhes moleculares elucidados neste trabalho para a DHODH de *Leishmania major*, corroboram a importância da questão da flexibilidade nos estudos envolvendo alvos proteicos e ligantes. Diferentes estados conformacionais são acessíveis à estrutura tridimensional para *Lm*DHODH e são imprescindíveis para a catálise, ressaltando a relevância em considerar os aspectos dinâmicos das interações no planejamento de inibidores seletivos para alvos enzimáticos.

Nossos resultados neste trabalho fornecem contribuições importantes sobre os mecanismos moleculares das DHODHs de classe 1A. A compreensão dinâmico-estrutural sobre como estas enzimas funcionam, no que se refere à cooperatividade mediada pela interface dimérica e a regulação dos movimentos dos *loops* catalíticos de cada monômero, nos instiga a pensar sobre os caminhos moleculares percorridos ao longo da evolução para que esse tipo de arquitetura fosse encontrada. As arquiteturas estruturais proteicas funcionam como verdadeiros fósseis moleculares que contam a história da vida. Entendendo este complexo processo, poderemos alcançar uma compreensão única sobre o caminho no qual a seleção evolucionária tem influenciado as propriedades dos sistemas moleculares no sentido de proporcionar um avanço funcional, uma vez que as proteínas são as responsáveis pela maior parte do trabalho celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.0 Referências bibliográficas

1. Hunter, G.K., *Chapter 4 - The Catalytic Force*, in *Vital Forces*. 2000, Academic Press: London. p. 75-99.
2. Jas, J., *Materialism and Vitalism in Biology by Peter Chalmers Mitchell.* Journal of Philosophical Studies, 1930. **5**(20): p. 631-633.
3. Lohff, B., *[The history of the concept of vital force].* Clio Med, 1981. **16**(2-3): p. 101-12.
4. Kinne-Saffran, E. and R.K. Kinne, *Vitalism and synthesis of urea. From Friedrich Wohler to Hans A. Krebs.* Am J Nephrol, 1999. **19**(2): p. 290-4.
5. Schwann, T., H. Smith, and M.J. Schleiden, *Microscopical researches into the accordance in the structure and growth of animals and plants*. 1847: The Sydenham Society.
6. Leicester, H.M. and H.S. Klickstein, *A source book in chemistry, 1400-1900*. 1952, New York: McGraw-Hill.
7. Hein, G.E., *The Liebig-Pasteur controversy: Vitality without vitalism.* Journal of Chemical Education, 1961. **38**(12): p. 614.
8. Kohler, R., *The Background to Eduard Buchner's Discovery of Cell-Free Fermentation.* Journal of the History of Biology, 1971. **4**(1): p. 35-61.
9. Stein, R.L., *Kinetics of enzyme action : essential principles for drug hunters*. 2011, Hoboken, N.J.: Wiley. xii, 302 p.
10. Kastle, J.H., *ON THE VITAL ACTIVITY OF THE ENZYMES.* Science, 1901. **13**(333): p. 765-71.
11. Radzicka, A. and R. Wolfenden, *A proficient enzyme.* Science, 1995. **267**(5194): p. 90-3.
12. Cramer, F., *Emil Fischer's Lock-and-Key Hypothesis after 100 years—Towards a Supracellular Chemistry*, in *Perspectives in Supramolecular Chemistry*. 1994, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-23.
13. Brown, A.J., *XXXVI.-Enzyme action.* Journal of the Chemical Society, Transactions, 1902. **81**(0): p. 373-388.
14. Voet, D., J.G. Voet, and C.W. Pratt, *Fundamentals of biochemistry : life at the molecular level*. 2013, Hoboken, NJ: Wiley.
15. Michaelis, L., et al., *The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper.* Biochemistry, 2011. **50**(39): p. 8264-9.
16. Chang, R., *Physical chemistry for the biosciences*. 2005, Sausalito: University Science Books.
17. Briggs, G.E. and J.B. Haldane, *A Note on the Kinetics of Enzyme Action.* Biochem J, 1925. **19**(2): p. 338-9.
18. Hill, C.M., R.D. Waight, and W.G. Bardsley, *Dose any enzyme follow the Michaelis-Menten equation?* Mol Cell Biochem, 1977. **15**(3): p. 173-8.
19. Murray, R.K., *Harper's illustrated biochemistry*. 2012, New York: McGraw-Hill Medical.
20. Johnson, K.A., *Advances in transient-state kinetics.* Current Opinion in Biotechnology, 1998. **9**(1): p. 87-89.
21. Sumner, J.B., *THE ISOLATION AND CRYSTALLIZATION OF THE ENZYME UREASE: PRELIMINARY PAPER.* Journal of Biological Chemistry, 1926. **69**(2): p. 435-441.
22. Kruger, K., et al., *Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena.* Cell, 1982. **31**(1): p. 147-57.
23. Armstrong, E.F., *Enzymes. By J.B.S. Haldane, M.A. Monographs on Biochemistry. Edited by R.H.A. Plimmer, D.Sc., and Sir F. G. Hopkins, M.A., M.B., D.Sc., F.R.S. Pp. vii+235. London: Longmans, Green & Co., 1930. Price 14s.* Journal of the Society of Chemical Industry, 1930. **49**(44): p. 919-920.
24. Pauling, L., *Molecular Architecture and Biological Reactions.* Chemical & Engineering News Archive, 1946. **24**(10): p. 1375-1377.
25. Wolfenden, R., *Transition state analogues for enzyme catalysis.* Nature, 1969. **223**(5207): p. 704-5.

26. Gutteridge, A., *Understanding the Relationship Between Enzyme Structure and Catalysis*, in *Darwin College*. 2005, Cambridge. p. 245.
27. Koshland, D.E., *The Key–Lock Theory and the Induced Fit Theory.* Angewandte Chemie International Edition in English, 1995. **33**(23-24): p. 2375-2378.
28. Ma, B., et al., *Folding funnels and binding mechanisms.* Protein Eng, 1999. **12**(9): p. 713-20.
29. Anfinsen, C.B., *Principles that govern the folding of protein chains.* Science, 1973. **181**(4096): p. 223-30.
30. Honig, B., *Protein folding: from the levinthal paradox to structure prediction.* J Mol Biol, 1999. **293**(2): p. 283-93.
31. Pande, V.S. and D.S. Rokhsar, *Folding pathway of a lattice model for proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1273-8.
32. Dobson, C.M., *Protein folding and misfolding.* Nature, 2003. **426**(6968): p. 884-90.
33. Weikl, T.R. and F. Paul, *Conformational selection in protein binding and function.* Protein Sci, 2014. **23**(11): p. 1508-18.
34. Teague, S.J., *Implications of protein flexibility for drug discovery.* Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(7): p. 527-41.
35. Ljungdahl, P.O. and B. Daignan-Fornier, *Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in Saccharomyces cerevisiae.* Genetics, 2012. **190**(3): p. 885-929.
36. Carter, N.S., et al., *Purine and Pyrimidine Metabolism in Leishmania*, in *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*, H.K. Majumder, Editor. 2008, Springer New York: New York, NY. p. 141-154.
37. Moffatt, B.A. and H. Ashihara, *Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism.* Arabidopsis Book, 2002. **1**: p. e0018.
38. Epidemiológica, M.d.S.S.d.V.e.S.D.d.V., *Manual de Vigilância e Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed. 2013, Brasil. 179.
39. Ali, J.A., et al., *Pyrimidine salvage in Trypanosoma brucei bloodstream forms and the trypanocidal action of halogenated pyrimidines.* Mol Pharmacol, 2013. **83**(2): p. 439-53.
40. Garavito, M.F., H.Y. Narváez-Ortiz, and B.H. Zimmermann, *Pyrimidine Metabolism: Dynamic and Versatile Pathways in Pathogens and Cellular Development.* Journal of Genetics and Genomics, 2015. **42**(5): p. 195-205.
41. Gao, G., et al., *Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in Trypanosoma cruzi.* J Mol Biol, 1999. **285**(1): p. 149-61.
42. Wilson, Z.N., et al., *Genetic dissection of pyrimidine biosynthesis and salvage in Leishmania donovani.* J Biol Chem, 2012. **287**(16): p. 12759-70.
43. Hashimoto, M., et al., *Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for Trypanosoma cruzi growth in the mammalian host cell cytoplasm.* Biochem Biophys Res Commun, 2012. **417**(3): p. 1002-6.
44. Arakaki, T.L., et al., *Characterization of Trypanosoma brucei dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies.* Mol Microbiol, 2008. **68**(1): p. 37-50.
45. Annoura, T., et al., *The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions.* (0022-2844 (Print)).
46. Jones, M.E., *Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis.* (0066-4154 (Print)).
47. Macheroux, P., *UV-Visible Spectroscopy as a Tool to Study Flavoproteins*, in *Flavoprotein Protocols*, S.K. Chapman and G.A. Reid, Editors. 1999, Humana Press: Totowa, NJ. p. 1-7.
48. Walsh, C.T. and T.A. Wencewicz, *Flavoenzymes: versatile catalysts in biosynthetic pathways.* Nat Prod Rep, 2013. **30**(1): p. 175-200.
49. Takashima, E., et al., *Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in Trypanosoma cruzi.* Mol Biochem Parasitol, 2002. **122**(2): p. 189-200.

50. Reis, R.A., et al., *The mechanistic study of Leishmania major dihydro-orotate dehydrogenase based on steady- and pre-steady-state kinetic analysis.* Biochem J, 2016. **473**(5): p. 651-60.
51. Argyrou, A., M.W. Washabaugh, and C.M. Pickart, *Dihydroorotate dehydrogenase from Clostridium oroticum is a class 1B enzyme and utilizes a concerted mechansim of catalysis.* Biochemistry, 2000. **39**(34): p. 10373-10384.
52. Marcinkeviciene, J., et al., *Dihydroorotate dehydrogenase B of Enterococcus faecalis. Characterization and insights into chemical mechanism.* Biochemistry, 1999. **38**(40): p. 13129-13137.
53. Zameitat, E., et al., *Biochemical characterization of recombinant dihydroorotate dehydrogenase from the opportunistic pathogenic yeast Candida albicans.* Febs Journal, 2006. **273**(14): p. 3183-3191.
54. Cordeiro, A.T., P.R. Feliciano, and M.C. Nonato, *Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase.* Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, 2006. **62**: p. 1049-1051.
55. Fagan, R.L., et al., *Mechanism of flavin reduction in the class 1A dihydroorotate dehydrogenase from Lactococcus lactis.* Biochemistry, 2007. **46**(13): p. 4028-4036.
56. Pinheiro, M.P., J. Iulek, and M.C. Nonato, *Crystal structure of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase from Y strain.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **369**(3): p. 812-817.
57. Liu, S.P., et al., *Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents.* Structure with Folding & Design, 2000. **8**(1): p. 25-33.
58. Loffler, M., et al., *Drosophila melanogaster dihydroorotate dehydrogenase: the N-terminus is important for biological function in vivo but not for catalytic properties in vitro.* Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2002. **32**(9): p. 1159-1169.
59. Rawls, J., et al., *Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase.* European Journal of Biochemistry, 2000. **267**(7): p. 2079-2087.
60. Fagan, R.L. and B.A. Palfey, *Roles in Binding and Chemistry for Conserved Active Site Residues in the Class 2 Dihydroorotate Dehydrogenase from Escherichia coli.* Biochemistry, 2009. **48**(30): p. 7169-7178.
61. Couto, S.G., M.C. Nonato, and A.J. Costa-Filho, *Defects in vesicle core induced by Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase.* Biophysical Journal, 2008. **94**(5): p. 1746-1753.
62. Couto, S.G., M. Cristina Nonato, and A.J. Costa-Filho, *Site directed spin labeling studies of Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase N-terminal extension.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2011. **414**(3): p. 487-492.
63. Inaoka, D.K., et al., *Structures of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction.* Biochemistry, 2008. **47**(41): p. 10881-91.
64. Reis, R.A., et al., *Recombinant production, crystallization and crystal structure determination of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania (Viannia) braziliensis.* Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2015. **71**(Pt 5): p. 547-52.
65. Rowland, P., et al., *The crystal structure of Lactococcus lactis dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function.* Protein Science, 1998. **7**(6): p. 1269-1279.
66. Liu, Y., et al., *Structure of the putative dihydroorotate dehydrogenase from Streptococcus mutans.* Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2011. **67**(Pt 2): p. 182-7.
67. Rowland, P., et al., *Structure of dihydroorotate dehydrogenase B: Electron transfer between two flavin groups bridged by an iron-sulphur cluster.* Structure, 2000. **8**(12): p. 1227-1238.
68. Demmer, J.K., et al., *Insights into Flavin-based Electron Bifurcation via the NADH-dependent Reduced Ferredoxin:NADP Oxidoreductase Structure.* J Biol Chem, 2015. **290**(36): p. 21985-95.

69. Hurt, D.E., J. Widom, and J. Clardy, *Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor.* Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography, 2006. **62**: p. 312-323.
70. Hansen, M., et al., *Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain.* Protein Sci, 2004. **13**(4): p. 1031-42.
71. Deng, X., et al., *Fluorine modulates species selectivity in the triazolopyrimidine class of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase inhibitors.* J Med Chem, 2014. **57**(12): p. 5381-94.
72. Norager, S., et al., *E-coli dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases.* Structure, 2002. **10**(9): p. 1211-1223.
73. Cheleski, J., et al., *Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery.* Eur J Med Chem, 2010. **45**(12): p. 5899-909.
74. Cordeiro, A.T., et al., *Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from Leishmania major.* Biochimie, 2012. **94**(8): p. 1739-1748.
75. Ottosen, M.B., et al., *The dimeric dihydroorotate dehydrogenase A from Lactococcus lactis dissociates reversibly into inactive monomers.* Protein Science, 2002. **11**(11): p. 2575-2583.
76. Shi, J., et al., *Single-molecule kinetics reveals signatures of half-sites reactivity in dihydroorotate dehydrogenase A catalysis.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(15): p. 5775-5780.
77. *Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde.* Revista de Saúde Pública, 2010. **44**: p. 200-202.
78. Conteh, L., T. Engels, and D.H. Molyneux, *Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases.* Lancet, 2010. **375**(9710): p. 239-47.
79. Herwaldt, B.L., *Leishmaniasis.* Lancet, 1999. **354**(9185): p. 1191-9.
80. Hotez, P.J. and R.T. Fujiwara, *Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card.* (1769-714X (Electronic)).
81. Organization, W.H., *Global Health Observatory Data Repository*. 2013.
82. Christopherson, R.I., S.D. Lyons, and P.K. Wilson, *Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs.* Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(11): p. 961-971.
83. Chen, S.F., et al., *INHIBITION OF DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE-ACTIVITY BY BREQUINAR SODIUM.* Cancer Research, 1992. **52**(13): p. 3521-3527.
84. Jockel, J., B. Wendt, and M. Loffler, *Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria.* Biochemical Pharmacology, 1998. **56**(8): p. 1053-1060.
85. Harder, A. and A. Haberkorn, *POSSIBLE MODE OF ACTION OF TOLTRAZURIL - STUDIES ON 2 EIMERIA SPECIES AND MAMMALIAN AND ASCARIS-SUUM ENZYMES.* Parasitology Research, 1989. **76**(1): p. 8-12.
86. Ittarat, I., et al., *EFFECTS OF ATOVAQUONE AND OTHER INHIBITORS ON PNEUMOCYSTIS-CARINII DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995. **39**(2): p. 325-328.
87. Goldenberg, M.M., *Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis.* Clin Ther, 1999. **21**(11): p. 1837-52; discussion 1821.
88. Burris, H.A., et al., *Pharmacokinetic and phase I studies of brequinar (DUP 785; NSC 368390) in combination with cisplatin in patients with advanced malignancies.* Invest New Drugs, 1998. **16**(1): p. 19-27.
89. Palfey, B.A., O. Björnberg, and K.F. Jensen, *Specific inhibition of a family 1A dihydroorotate dehydrogenase by benzoate pyrimidine analogues.* J Med Chem, 2001. **44**(18): p. 2861-4.
90. Frearson, J.A., et al., *Target assessment for antiparasitic drug discovery.* Trends Parasitol, 2007. **23**(12): p. 589-95.

91. Feliciano, P.R., et al., *Cloning, expression, purification, and characterization of Leishmania major dihydroorotate dehydrogenase.* Protein Expr Purif, 2006. **48**(1): p. 98-103.
92. Pádua, R.A.P., et al., *ThermoFMN - a thermofluor assay developed for ligand-screening as an alternative strategy for drug discovery.* Journal of the Brazilian Chemical Society, 2014. **25**: p. 1864-1871.
93. Gibson, Q.H. and L. Milnes, *Apparatus for rapid and sensitive spectrophotometry.* Biochem J, 1964. **91**(1): p. 161-71.
94. Larsen, D. *ChemWiki*. [cited 2014 Abril]; Available from: http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Analytical_Chemistry/Analytical_Chemistry_2.0/13_Kinetic_Methods/13B%3A_Chemical_Kinetics.
95. O'Brien, R. and I. Haq, *Applications of Biocalorimetry: Binding, Stability and Enzyme Kinetics*, in *Biocalorimetry 2*. 2004, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-34.
96. Heckman, K.L. and L.R. Pease, *Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension.* Nat Protoc, 2007. **2**(4): p. 924-32.
97. Corpet, F., *Multiple sequence alignment with hierarchical clustering.* Nucleic Acids Res, 1988. **16**(22): p. 10881-90.
98. Pantoliano, M., et al., *High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery.* Journal of Biomolecular Screening, 2001. **6**(6): p. 429-440.
99. Niesen, F., H. Berglund, and M. Vedadi, *The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability.* Nature Protocols, 2007. **2**(9): p. 2212-2221.
100. Lo, M., et al., *Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery.* Analytical Biochemistry, 2004. **332**(1): p. 153-159.
101. Guimarães, B.G., et al., *The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS.* J Synchrotron Radiat, 2009. **16**(Pt 1): p. 69-75.
102. Kabsch, W., *Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 133-44.
103. Evans, P., *An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics.* Acta Crystallographica Section D, 2011. **67**(4): p. 282-292.
104. Brünger, A.T., *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures.* Nature, 1992. **355**(6359): p. 472-5.
105. McCoy, A.J., et al., *Phaser crystallographic software.* J Appl Crystallogr, 2007. **40**(Pt 4): p. 658-674.
106. Afonine, P.V., et al., *Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine.* (1399-0047 (Electronic)).
107. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
108. Emsley, P., et al., *Features and development of Coot.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 4): p. 486-501.
109. ForteBio. *BLI applications notes*. [cited 2015 July]; Available from: http://www.fortebio.com/literature.html.
110. Miller, R.W., *Dihydroorotate dehydrogenase (Neurospora).* Methods Enzymol, 1978. **51**: p. 63-9.
111. Zhang, J.H., T.D. Chung, and K.R. Oldenburg, *A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays.* J Biomol Screen, 1999. **4**(2): p. 67-73.
112. Fagan, R.L., et al., *Mechanism of flavin reduction in class 2 dihydroorotate dehydrogenases.* Biochemistry, 2006. **45**(50): p. 14926-14932.
113. Palfey, B.A., O. Björnberg, and K.F. Jensen, *Insight into the chemistry of flavin reduction and oxidation in Escherichia coli dihydroorotate dehydrogenase obtained by rapid reaction studies.* Biochemistry, 2001. **40**(14): p. 4381-90.

114. Norager, S., et al., *Lactococcus lactis dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function.* Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(31): p. 28812-28822.
115. Bjornberg, O., et al., *Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from Lactococcus lactis investigated by chemical modification and mutagenesis.* Biochemistry, 1997. **36**(51): p. 16197-16205.
116. Pinheiro, M.P., F.d.S. Emery, and M. Cristina Nonato, *Target Sites for the Design of Anti-trypanosomatid Drugs Based on the Structure of Dihydroorotate Dehydrogenase.* Current Pharmaceutical Design, 2013. **19**(14): p. 2615-2627.
117. Hines, V. and M. Johnston, *MECHANISTIC STUDIES ON THE BOVINE LIVER MITOCHONDRIAL DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE USING KINETIC DEUTERIUM-ISOTOPE EFFECTS.* Biochemistry, 1989. **28**(3): p. 1227-1234.
118. Diederichs, K. and P.A. Karplus, *Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography.* Nat Struct Biol, 1997. **4**(4): p. 269-75.
119. Shanks, E., R. Ketteler, and D. Ebner, *Academic drug discovery within the United Kingdom: a reassessment.* Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(7): p. 510-510.