UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato
desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*

Matheus Pinto Pinheiro

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato
desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major***

Matheus Pinto Pinheiro

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato
desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major***

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 25/04/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientado: Matheus Pinto Pinheiro

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Nonato Costa

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pinheiro, Matheus Pinto.

Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*. Ribeirão Preto, 2012.

169 p.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Química e Física Biológica.

Orientadora: Nonato, Maria Cristina

1. *Trypanosoma cruzi* cepa Y. 2. *Leishmania major*. 3. Diidroorotato desidrogenase. 4. Planejamento de inibidores. 5. Docagem. 6. Cristalografia de raios-X.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus Pinto Pinheiro

Planejamento de inibidores das enzimas enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Nonato Costa

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais,
Carlos e Ana Catarina,
e irmãos,
Ana Carla e Thiago,
grandes incentivadores.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de antecipar meus agradecimentos a toda e qualquer pessoa que tenha me ajudado de alguma forma durante o desenvolvimento deste trabalho. Assim, já me sinto aliviado de não estar sendo injusto com alguns. Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração de muitas pessoas as quais gostaria de exprimir os meus sinceros agradecimentos.

À minha orientadora, Cris, que hoje sou extremamente grato, me deu todo suporte para o desenvolvimento deste trabalho, sempre apontando os melhores caminhos e, junto comigo, elaborando pesquisa de qualidade e buscando novas informações. É claro, pela grande amizade, extrema dedicação na minha orientação, paciência, apoio e, principalmente, pela confiança em mim depositada desde o dia que me juntei ao LCP.

Ao professor Bill Hunter, da *University of Dundee*, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório durante meu estágio de caráter sanduíche. E também a todo seu grupo que me acolheu de uma forma exemplar, principalmente Tom e Vincent que me ajudaram com os experimentos de Termofluor e cristalização automatizada.

À professora Ruth Brenk, da *University of Dundee*, também pela grande oportunidade de estagiar em seu laboratório durante meu estágio de caráter sanduíche. Um agradecimento especial para Waldemar que me ajudou durante todos os experimentos de docagem.

Ao professor Flávio da Silva Emery que nos cedeu diversas moléculas para serem testadas durante meu período de doutoramento, além de participar ativamente de nossas discussões.

Ao professor Brian K. Shoichet e sua aluna de doutorado Rafaela Ferreira, pela ajuda em uma das estratégias adotadas nos experimentos de docagem.

À professora Angela Kaysel Cruz e sua aluna de pós-doutorado Camila Figueiredo Pinzan, pelos testes realizados com nossos inibidores em cultura de *Leishmania*.

Ao grupo de Estudos em Química Medicinal Nequimed, pelo trabalho realizado em conjunto.

Ao Laboratório de Toxinas Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela disponibilização de inúmeros aparelhos durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Cristalografia de Proteínas de Ribeirão Preto (LCP): Paty, Ricardo, Aline, Joane, Adam, Juliana, e aos antigos integrantes deste grupo, Val, Cíntia, Renata, Ana Lúcia. Agradeço pelos questionamentos constantes que me fizeram aprender cada vez mais, além da amizade e da agradável convivência.

Às técnicas, Karla, Flávia, Iara e Juliana, pela disponibilização e o auxílio no laboratório.

À secretária do departamento de física e química, Cidinha, pelos favores e prestação de serviços de suporte ao bom funcionamento do departamento.

Aos meus pais, que me ajudaram até os últimos minutos, literalmente, meus irmãos Ana Carla e Thiago, meus cunhados Carmem e William, meus sobrinhos Felipe e Pedro.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando: Ewister, Gui, Diego, Remo, Junior, Mario, dentre tantos outros. Valeu pela força.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela oportunidade de realização do curso de doutorado. E aos funcionários desta instituição, pela ajuda que de alguma maneira me foi prestada.

À *University of Dundee*, pelo acolhimento em suas dependências me proporcionando toda a infraestrutura necessária para o desenvolvimento do meu projeto.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), por colocar a disposição toda infraestrutura necessária para a coleta de dados de difração de raios-X.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de doutorado (processo nº 151666/2008-0) usufruída no início do desenvolvimento deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (processo nº 07/08703-0) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A todos meu muito obrigado!

“Não se pode ensinar alguma coisa a alguém, pode-se apenas auxiliar a descobrir por si mesmo.”

Galileu Galilei

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	xii
Lista de abreviaturas	xv
1 - INTRODUÇÃO	01
1.1 - DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS	02
1.2 - DOENÇA DE CHAGAS	03
1.2.1 - Histórico	03
1.2.2 - Ciclo de vida - <i>Trypanosoma cruzi</i>	04
1.2.3 - Transmissão	05
1.2.4 - Patogenia	06
1.2.5 - Distribuição	07
1.2.6 - Prevenção e Tratamento	08
1.3 - LEISHMANIOSE	10
1.3.1 - Histórico	10
1.3.2 - Ciclo de vida - <i>Leishmania spp</i>	10
1.3.3 - Transmissão	11
1.3.4 - Patogenia	12
1.3.5 - Distribuição	12
1.3.6 - Tratamento	14
1.4 - PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS	16
1.5 - DIIDROOROTATO DESIDROGENASE	19
1.5.1 - Via <i>de novo</i> de nucleotídeos de pirimidina	19
1.5.2 - Classificação das enzimas DHODHs	20
1.5.3 - Características estruturais das enzimas DHODHs	21
1.5.4 - Mecanismo catalítico das enzimas DHODHs	25
1.5.5 - DHODHs de tripanossomatídeos	28
1.5.6 - Inibidores das enzimas DHODHs	30
2 - OBJETIVOS	35
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 - PRODUÇÃO HETERÓLOGA DAS ENZIMAS DHODHs	38
3.1.1 - LmDHODH	38
3.1.2 - TcDHODH-Y	38
3.1.2.1 - Cromatografia de interação hidrofóbica	39
3.1.2.2 - Avaliação da atividade enzimática das frações I e II	40
3.1.3 - TcDHODH-Y-SHis	41
3.1.3.1 - Clonagem da enzima TcDHODH-Y-SHis	41
3.1.3.2 - Teste de expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis	45
3.1.3.3 - Expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis	46
3.1.3.4 - Purificação da enzima TcDHODH-Y-SHis	46
3.1.4 - HsDHODH	49
3.1.4.1 - Clonagem da enzima HsDHODH	49
3.1.4.2 - Teste de expressão da enzima HsDHODH	53

3.1.4.3 - Expressão da enzima HsDHODH.....	54
3.1.4.4 - Purificação da enzima HsDHODH.....	54
3.1.4.5 - Dosagem da enzima HsDHODH.....	55
3.2 - OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE PARTIDA.....	56
3.2.1 - Varredura <i>in silico</i> em biblioteca de compostos.....	56
3.2.1.1 - Identificação de sítios alvos nas DHODHs de tripanossomatídeos.....	57
3.2.1.2 - Varredura virtual de moléculas bioativas - Primeira Geração.....	58
3.2.1.2.1 - Varredura virtual de ligantes - Estratégia I.....	58
3.2.1.2.2 - Varredura virtual de ligantes - Estratégia II.....	63
3.2.1.2.3 - Varredura virtual de ligantes - Estratégia III.....	64
3.2.1.3 - Varredura virtual de moléculas bioativas - Segunda Geração.....	64
3.2.2 - Varredura em biblioteca de compostos por Termofluor.....	67
3.2.3 - Varredura em biblioteca de compostos com atividade antiparasitária.....	69
3.3 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO.....	69
3.3.1 - DHODHs de tripanossomatídeos.....	70
3.3.2 - DHODH humana - validação cruzada.....	72
3.4 - ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS DHODHs POR CRISTALOGRAFIA.....	74
3.4.1 - Cristalização, coleta e processamento de dados, resolução da estrutura e refinamento.....	74
3.4.2 - TcDHODH-Y-SHis.....	75
3.4.3 - TcDHODH-Y.....	78
3.4.3.1 - Cristalização das frações I e II da enzima TcDHODH-Y.....	78
3.4.3.2 - Cristalização robotizada da fração I da enzima TcDHODH-Y.....	79
3.4.4 - LmDHODH.....	79
3.4.4.1 - Compostos provenientes da varredura <i>in silico</i>	80
3.4.4.2 - Compostos provenientes da varredura por Termofluor.....	81
3.4.4.3 - Compostos provenientes da varredura em biblioteca de compostos com atividade antiparasitária.....	82
3.5 - AVALIAÇÃO <i>IN VIVO</i> DOS INIBIDORES DAS ENZIMAS TcDHODH-Y E LMDHODH.....	83
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	84
4.1 - PRODUÇÃO HETERÓLOGA DAS ENZIMAS DHODHs.....	85
4.1.1 - LmDHODH.....	85
4.1.2 - TcDHODH-Y.....	85
4.1.2.1 - Cromatografia de interação hidrofóbica.....	85
4.1.2.2 - Avaliação da atividade enzimática das frações I e II.....	88
4.1.3 - TcDHODH-Y-SHis.....	89
4.1.3.1 - Clonagem da enzima TcDHODH-Y-SHis.....	89
4.1.3.2 - Teste de expressão e expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis.....	90
4.1.3.3 - Purificação da enzima TcDHODH-Y-SHis.....	91
4.1.4 - HsDHODH.....	96
4.1.4.1 - Clonagem da enzima HsDHODH.....	96
4.1.4.2 - Teste de expressão da enzima HsDHODH.....	97
4.1.4.3 - Purificação da enzima HsDHODH.....	98
4.2 - OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE PARTIDA.....	99
4.2.1 - Varredura <i>in silico</i> em biblioteca de compostos.....	99
4.2.1.1 - Identificação de sítios alvos nas DHODHs de tripanossomatídeos.....	99
4.2.1.2 - DHODHs de tripanossomatídeos.....	104
4.2.1.3 - Varredura virtual de moléculas bioativas - Primeira Geração.....	106

4.2.1.3.1 - Varredura virtual de ligantes - Estratégia I.....	106
4.2.1.3.2 - Varredura virtual de ligantes - Estratégia II.....	108
4.2.1.3.3 - Varredura virtual de ligantes - Estratégia III.....	111
4.2.1.4 - Varredura virtual de moléculas bioativas - Segunda Geração.....	112
4.2.2 - Varredura em biblioteca de compostos por Termofluor.....	117
4.2.3 - Varredura <i>in vitro</i> por ensaio espectrofotométrico.....	119
4.3 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO.....	121
4.3.1 - Avaliação do potencial inibitório das moléculas identificadas pela varredura <i>in silico</i> em biblioteca de compostos.....	121
4.3.2 - Avaliação do potencial inibitório das moléculas identificadas pela varredura em biblioteca de compostos por Termofluor.....	125
4.3.3 - Avaliação do potencial inibitório das moléculas identificadas com atividade antiparasitária previamente avaliada.....	125
4.4 - ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS DHODHS POR CRISTALOGRAFIA.....	130
4.4.1 - TcDHODH-Y-SHis.....	130
4.4.2 - TcDHODH-Y.....	131
4.4.2.1 - Cristalização robotizada da fração I da enzima TcDHODH-Y.....	132
4.4.3 - LmDHODH.....	133
4.4.3.1 - Cristalização com compostos provenientes da varredura <i>in silico</i>	133
4.4.3.1.1 - Moléculas da primeira geração.....	133
4.4.3.1.2 - Moléculas da segunda geração.....	136
4.4.3.2 - Cristalização com compostos identificados por Termofluor.....	140
4.4.3.3 - Cristalização na presença de compostos sintéticos.....	146
4.4.3.3.1 - Compostos com atividade anti-leishmania.....	146
4.4.3.3.2 - Fragmentos dos compostos com atividade anti-leishmania.....	149
5- CONCLUSÕES	155
6- REFERÊNCIAS	159

RESUMO

PINHEIRO, M.P. **Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major***. 2012. 169f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) catalisa a conversão de diidroorotato em orotato, a quarta e única reação redox da via metabólica da síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina. DHODH tem sido explorada como alvo validado para terapias contra doenças proliferativas e parasitárias e, em particular, tem sido considerada um alvo atraente para o planejamento de fármacos com ação contra tripanossomatídeos, como parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, que conjuntamente são responsáveis por doenças e mortes que acometem milhões de pessoas em todo o mundo. Neste trabalho, através da combinação de técnicas de DNA recombinante, termofluor, cristalografia de raios-X e ensaios de inibição *in vitro* e *in silico*, foi possível identificar sítios alvos na estrutura da DHODH para o desenvolvimento de ligantes, identificar inibidores potentes e seletivos contra as DHODHs de *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi* e, caracterizar seus mecanismos de inibição. Finalmente, o efeito leishmanicida observado em nossos ensaios anti-promastigota e os baixos níveis de citotoxicidade observados em células de mamíferos sugerem que alguns dos compostos identificados durante o desenvolvimento deste projeto como potentes inibidores da enzima DHODH poderão ser utilizados como protótipos para o desenvolvimento de fármacos com ação leishmanicida e tripanocida. Combinados, nossos resultados forneceram uma nova e importante contribuição para a compreensão do mecanismo de ação das enzimas DHODH da classe 1A e para o desenho de fármacos baseado nas estruturas das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*. Além disso, a alta identidade sequencial e estrutural observada entre as enzimas de tripanossomatídeos sugerem que uma única estratégia para o desenho de inibidores baseado em estrutura poderá ser usada para explorar a enzima DHODH como alvo terapêutico para várias doenças negligenciadas tropicais como Leishmaniose, Doença do sono e Doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi* cepa Y; *Leishmania major*, Diidroorotato desidrogenase; Planejamento de inibidores; Docagem; Cristalografia de raios-X.

ABSTRACT

PINHEIRO, M.P. **Design of inhibitors for dihydroorotate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major***. 2012. 169f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) catalyses the conversion of dihydroorotate to orotate, the fourth step and only redox reaction in the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway. DHODH has been exploited as a validated target for therapy against proliferative and parasitic diseases, and in particular, has been considered to be an attractive target for drug development against trypanosomatids, such as parasites from the genera *Leishmania* and *Trypanosoma* that collectively cause disease and death in millions of humans. In this work, by combining recombinant DNA technology, thermofluor, X-ray crystallography and *in vitro* and *in silico* inhibition assays, we have been able to identify target sites for ligand design, identify potent and selective inhibitors against trypanosomatid DHODHs and fully characterize their mechanism of inhibition. Finally, the *anti-leishmanial* effect observed in our anti-promastigote assays and the low cytotoxicity levels observed against mammalian cells strongly suggest that some of the compounds identified during the development of this project as potent DHODH inhibitors can be used as prototypes for the development of anti-leishmania and anti-trypanosoma drugs. Altogether, our findings provide a new and important contribution to the understanding of the mechanism of action of class 1A DHODHs and for the structure-assisted design of inhibitors against trypanosomatid DHODHs. Furthermore, the high sequence and structural similarity observed among trypanosomatid DHODH suggest that a single strategy of structure-based inhibitor design can be used to exploit DHODH as a druggable target against multiple neglected tropical diseases such as Leishmaniasis, Sleeping Sickness and Chagas' Disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi* Y strain; *Leishmania major*, Dihydroorotate dehydrogenase; Inhibitor design; Docking; X-ray crystallography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo de vida do parasito <i>Trypanosoma cruzi</i> , agente causador da doença de Chagas. O ciclo se inicia com a picada do inseto vetor que libera a forma infectante tripomastigota metacíclica nas fezes ou na urina. Os parasitos se transformam em amastigotas nas células infectadas e se transformam em tripomastigotas sanguíneos e entram na corrente sanguínea. Durante a picada, o inseto vetor é contaminado com a forma tripomastigota sanguínea que se transforma em epimastigota no intestino do inseto. Imagem adaptada do CDC (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/)	04
Figura 2	Inseto <i>Triatoma infestans</i> , barbeiro, responsável pela transmissão vetorial da doença de Chagas	05
Figura 3	Número de casos e distribuição da infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , baseados em estimativas oficiais e do status da transmissão vetorial, no mundo todo, entre 2006-2009. Imagem adaptada da OMS	08
Figura 4	Representação da estrutura química dos compostos (a) benznidazol e (b) nifurtimox	09
Figura 5	Ciclo de vida do parasito do gênero <i>Leishmania ssp</i> , agente causador dos diferentes tipos de Leishmaniose. Imagem retirada e adaptada do CDC (http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/)	11
Figura 6	Inseto <i>Lutzomyia longipalpis</i> , mosquito-palha, responsável pela transmissão vetorial da Leishmaniose	12
Figura 7	Número e distribuição de casos de LC , no mundo todo, entre 2005-2009. Imagem adaptada da OMS	13
Figura 8	Número e distribuição de casos de LV , no mundo todo, entre 2005-2009. Imagem adaptada da OMS	14
Figura 9	Representação da estrutura química dos compostos (a) estibogluconato de sódio e (b) antimoniato-N-metil glucamina	15
Figura 10	Representação da estrutura química dos compostos (a) pentamidina e (b) anfotericina B	15
Figura 11	Etapas da biossíntese <i>de novo</i> de nucleotídeos de pirimidinas. Figura adaptada de Nelson e Cox (2002)	20
Figura 12	Estrutura de um monômero da enzima (a) TcDHODH-Y (PDB código 3C3N) e estrutura da enzima (b) HsDHODH (PDB código 1D3G). Em azul claro estão representadas as β -fitas e em rosa as α -hélices. No caso da enzima humana, está representado em azul escuro as duas α -hélices que formam o domínio de membrana. O FMN presente em ambas estrutural está representado em amarelo. A região representada em verde corresponde a alça catalítica de ambas as enzimas, situado no topo do barril α/β	22
Figura 13	Sugestão do mecanismo da oxidação do DHO. A conversão do DHO a orotato ocorre via um simples estado de transição, no qual a cisteína catalítica, Cys132 no caso da enzima TcDHODH-Y, desprotona o DHO com a transferência de um hidreto ao FMN. Figura adaptada de FAGAN (2007)	26
Figura 14	Mecanismo catalítico proposto para as enzimas DHODHs da classe 1A. Na primeira etapa ocorre a oxidação do DHO a orotao. Na segunda etapa ocorre a redução do fumarato a succinato. Os resíduos envolvidos estão descritos em fonte negrito, correspondente a enzima TcDHODH-Y (PDB código 3C3N), e itálico,	

	correspondente a enzima LmDHODH (PDB código 3GZ3). Em azul estão representadas as numerações dos átomos de carbono e nitrogênio do orotato e FMN. Figura adaptada de INAOKA (2008).....	27
Figura 15	Estrutura dos inibidores das enzimas DHODHs da classe 2. (a) A771726, (b) Brequinar e (c) Atavacona.....	31
Figura 16	Representação da superfície da estrutura das enzimas (a) HsDHODH (PDB código 1D3G) e (b) LmDHODH (PDB código 3TQ0). O sítio ativo, também chamado de pirimidínico, está representado em magenta. Neste sítio está localizado a molécula de FMN (em amarelo) e o produto, orotato, da primeira etapa catalítica (em verde). Na enzima humana, o domínio de membrana, representado em ciano, é responsável pela formação de um sítio adicional por onde o agente oxidante da classe 2 das DHODHs passa. Também chamado de sítio de interação da quinona, este sítio possui caráter hidrofóbico e não está presente na enzima LmDHODH. O inibidor Brequinar está mostrado em cinza situado no sítio de interação da quinona, bloqueando o acesso do agente oxidante a coenzima FMN.....	32
Figura 17	Mapa de interações dos compostos (a) 3,4-diOHB (PDB código 2BSL), (b) 3,5-diOHB (PDB código 2BX7) e (c) orotato (PDB código 2DOR) no sítio pirimidínico da enzima LmDHODH-A. Os resíduos com interações conservadas estão marcados com círculos da mesma cor. Os resíduos não conservados entre as enzimas DHODHs das diferentes classes estão marcados com asterisco. Figura gerada no programa PoseView (STIERAND; RAREY, 2007).....	33
Figura 18	Representação esquemática das etapas envolvidas na varredura virtual de ligantes utilizando a estratégia I. O processo envolve quatro etapas de filtragem. A primeira é realizada através da imposição de características físico-químicas desejadas, e as demais por docagem utilizando diferentes programas.....	58
Figura 19	Representação esquemática das etapas envolvidas na varredura virtual de ligantes utilizando a estratégia II. O processo envolve apenas uma etapa de filtragem, efetuada por docagem.....	63
Figura 20	Representação esquemática das etapas envolvidas na varredura virtual da segunda geração de ligantes. O processo envolve três etapas de filtragem: Na primeira são selecionados compostos com características físico-químicas desejadas; na segunda são selecionados compostos com grupamentos capazes de manter as interações desejadas; na terceira através de experimentos de docagem.....	65
Figura 21	Representação do sítio ativo da enzima LmDHODH em complexo com inibidor da primeira geração, ácido 5-nitroorótico. Conforme demonstrado, o sítio ativo possui duas regiões doadoras de hidrogênio (esferas em azul) e uma região aceptora de hidrogênio (esfera em vermelho), que são responsáveis pela interação com as duas regiões aceptoras de hidrogênio e uma região doadora de hidrogênio, conservadas nos ligantes encontrados no sítio ativo.....	66
Figura 22	Representação das estruturas químicas do agente colorimétrico 2,6 - dicloroindofenol oxidado (DCIP) e reduzido (DCIPH ₂).....	70
Figura 23	Representação do mecanismo geral da reação catalítica promovida pelas enzimas DHODHs.....	70
Figura 24	Representação do mecanismo geral da reação catalítica promovida pelas enzimas DHODHs.....	73
Figura 25	Representação dos dois métodos de cristalização por difusão de vapor: (a) em gota suspensa e (b) em gota sentada.....	75

- Figura 26** Alinhamento sequencial entre as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH. Os resíduos que compõem o sítio ativo estão indicados com uma estrela..... 80
- Figura 27** Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y por cromatografia de interação hidrofóbica com eluição realizada por gradiente decrescente de sal, utilizando duas colunas acopladas HiTrap Phenyl HP de 1mL cada (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorbância, em verde a curva da condutividade e em vermelho a curva da concentração do tampão A em função do volume de eluição..... 86
- Figura 28** Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y por cromatografia de interação hidrofóbica com eluição realizada em estepes, utilizando duas colunas acopladas HiTrap Phenyl HP de 1mL cada (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorbância, em verde a curva da condutividade e em vermelho a curva da concentração do tampão B..... 87
- Figura 29** SDS-PAGE -12%. Padrão de massa molecular (MM). Amostra 1 refere-se ao primeiro pico da cromatografia de interação hidrofóbica em "step". Amostra 2 refere-se ao segundo pico da cromatografia de interação hidrofóbica em "step". Amostra 3 refere-se à amostra de proteína antes da injeção na cromatografia de interação hidrofóbica (proteína purificada utilizando apenas a cromatografia por afinidade)..... 88
- Figura 30** Curvas de absorbância a 300 nm em função do tempo (s). A concentração dos substratos fumarato e diidroorotato foi, respectivamente, 1 mM e 30 μ M. A curva em preto representa a medida da formação de orotato em função do tempo utilizando a enzima TcDHODH-Y eluída no primeiro pico. A curva em vermelho demonstra que não ocorre formação de produto quando é utilizada a enzima TcDHODH-Y eluída no segundo pico..... 89
- Figura 31** Gel de agarose 0,8 % (m/v). **(a)** Amplificação do gene TcDHODH-Y por reação de PCR a partir de amostra de DNA da construção TcDHODH-Y-pET28a(+), variando a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. M - Marcador 1 Kb DNA Ladder (Biolab) **(b)** Amplificação do gene de interesse por reação de PCR usando temperatura de anelamento de 55 °C..... 90
- Figura 32** SDS-PAGE-12%. Ensaios de expressão a 25°C para a construção TcDHODH-Y-SHis (~34kDa) variando o tempo de indução (5 e 20 horas) e a concentração de IPTG (0; 0,1; 0,5 e 1,0mM). Os retângulos em amarelo indicam as bandas de expressão da proteína na forma solúvel. MM representa o padrão de massa molecular. A figura representa o experimento realizado com **(a)** 5 horas de indução e **(b)** 20 horas de indução..... 91
- Figura 33** Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y-SHis por cromatografia de troca aniônica, utilizando a coluna C10/10 contendo 10 mL da resina DEAE-FF (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorbância, em vermelho a curva da condutividade e em verde a curva da concentração do tampão B, que variou de 0 a 100% em 60mL de corrida. As frações estão representadas em vermelho com as respectivas numerações dos tubos coletados... 92
- Figura 34** SDS-PAGE-12%. **(a)** Padrão de massa molecular (MM) e amostras dos tubos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. **(b)** Padrão de massa molecular (MM), amostra da proteína antes de ser injetada na purificação (inj) e amostras dos tubos 13, 14, 16, 18 e 20. TcDHODH-Y-SHis migra com massa molecular de aproximadamente 34 kDa..... 93
- Figura 35** Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y-SHis por cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando a coluna HiTrap Phenyl HP de 1mL (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorbância, em vermelho a curva da condutividade e em verde a curva da concentração do tampão B, que

	variou de 0 a 100% em 25mL de corrida. As frações estão representadas em vermelho com as respectivas numerações dos tubos coletados.....	94
Figura 36	SDS-PAGE-12%. (a) Padrão de massa molecular (MM), amostra antes de ser injetada na purificação (inj) e amostras dos tubos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. (b) Amostras dos tubos 2, 3, 4, 5, padrão de massa molecular (MM) e amostras dos tubos 14, 15, 16, 17 e 18. TcDHODH-Y-SHis migra com massa molecular de aproximadamente 34 kDa.....	94
Figura 37	Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y-SHis por cromatografia de filtração em gel, utilizando a coluna Sephacryl™ S-100. Em azul está representada a curva de absorbância. As frações estão representadas em vermelho com as respectivas numerações dos tubos coletados.....	95
Figura 38	Gel de agarose 0,8% (m/v). As duas primeiras colunas correspondem ao produto de digestão do plasmídeo HsDHODH-pET22b digerido com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i> . Os retângulos em amarelo correspondem ao gene da enzima HsDHODH que foi excisado do gel para purificação. A terceira coluna (M) corresponde ao Marcador 1 Kb DNA Ladder (Biolab): 10; 8; 6; 5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 e 0,25 kb. A quarta e quinta coluna corresponde ao produto.....	96
Figura 39	SDS-PAGE-12%. Ensaios de expressão a 25°C para a construção HsDHODH (~44kDa) variando o tempo de indução (3, 6 e 20 horas) e a concentração de IPTG (5, 100 e 500 µM). Os retângulos em amarelo indicam as bandas de expressão da proteína na forma solúvel. MM representa o padrão de massa molecular. Na figura está representado o resultado do experimento realizado com (a) 3 horas de indução, (b) 6 horas de indução e (c) 20 horas de indução.....	97
Figura 40	SDS-PAGE-12%. Padrão de massa molecular (MM) e perfil das eluições com 250 mM imidazol.....	98
Figura 41	Representação em estéreo das cavidades identificadas como potenciais sítios para os experimentos de varredura virtual de moléculas bioativas. A superfície representada em cinza claro corresponde a um monômero A e em cinza escuro ao monômero B da enzima TcDHODH. Em rosa está representado o sítio ativo (S1) que não se encontra exposto à superfície da proteína; em azul está representado o sítio S2 adjacente ao sítio catalítico; em laranja está representado o sítio S3 também adjacente ao sítio catalítico; em verde o sítio S4 que é complementar ao sítio S3 e é formado por resíduos de ambos os monômeros; em vermelho o sítio S5 localizado na interface dimérica. Entre os sítios S2 e S3 encontra-se a alça catalítica representada na forma de "ribbon" transparente. Figura gerada no programa Pymol.....	99
Figura 42	Interações entre DHODH e o produto da reação, orotato. Resíduos presentes na enzima humana estão representados em fonte negrito, da enzima TcDHODH em fonte normal e da enzima LmDHODH em fonte itálico. Figura foi gerada baseando-se na estrutura tridimensional, depositadas no PDB, das enzimas complexadas com o produto da catálise: 2FPV (humana), 2E68 (<i>T. cruzi</i> cepa Tulahuen gene 2) e 3GZ3 (<i>L. major</i>). Selecionados com uma caixa em amarelo estão representados os resíduos que não apresentam identidade sequencial entre as enzimas DHODHs das diferentes classes. Figura adaptada de (CHELESKI et al., 2010).....	101
Figura 43	Alinhamento sequencial das enzimas DHODHs de diferentes espécies de <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i> demonstrando a alta identidade sequencial dividida entre essas enzimas. Na parte superior do sequenciamento estão representados os elementos de estrutura secundária correspondentes à enzima LmDHODH. Na parte inferior do sequenciamento estão marcados com asteriscos os resíduos envolvidos nos diferentes sítios: S1 (rosa); S2 (azul); S3 (laranja); S4 (verde) e S5 (vermelho). O alinhamento foi realizado no programa MultAlin e a figura construída	

	no programa ESPrit. Figura cedida gentilmente pela aluna de doutorado Patrícia Rosa Feliciano da FCFRP-USP.....	105
Figura 44	Representação do modo de interação da molécula LCPEN385 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia I de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanosomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	107
Figura 45	Representação do modo de interação da molécula LCPEN484 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia I de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanosomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	107
Figura 46	Representação do modo de interação da molécula LCPSP726 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia I de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanosomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	108
Figura 47	Representação do modo de interação da molécula LCPEN048 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia II de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	109
Figura 48	Representação do modo de interação da molécula LCPEN054 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia II de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	109
Figura 49	Representação do modo de interação da molécula LCPEN352 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia II de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em vermelho são distintos entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	110
Figura 50	Representação do modo de interação da molécula LCPSA407 com o sítio S1 preditos pela estratégia II de docagem. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	110
Figura 51	Representação do modo de interação da molécula LCPSA460 com o sítio S1 preditos pela estratégia II de docagem. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	111
Figura 52	Representação do modo de interação da molécula LCPEN889 com o sítio S1 preditos pela estratégia II de docagem. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em	

	amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	111
Figura 53	Representação das dez estruturas químicas das moléculas selecionadas para os estudos inibitórios contra a enzima TcDHODH-Y. Nesta ilustração, a molécula 3 corresponde ao produto da catálise, orotato, estão representadas as numerações dos átomos pertencentes à molécula. Figura gerada no programa MarvinSketch (http://www.chemaxon.com).....	112
Figura 54	Representação das interações entre o inibidor ácido 5-nitroorótico e o sítio S1 da enzima LmDHODH. Conforme demonstrado, o sítio ativo possui duas regiões doadoras de hidrogênio (esferas em azul) e uma região aceptora de hidrogênio esferas em vermelho), que são responsáveis pela interação com as duas regiões aceptoras de hidrogênio e uma região doadora de hidrogênio, presentes no ligante encontrado no sítio ativo.....	113
Figura 55	Representação do modo de interação da molécula LCPSP3027 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	114
Figura 56	Representação do modo de interação da molécula LCPVL898 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	114
Figura 57	Representação do modo de interação da molécula LCPVL161 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	115
Figura 58	Representação do modo de interação da molécula LCPVL900 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos entre todas as DHODHs, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	115
Figura 59	Representação do modo de interação da molécula LCPVL682 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	116
Figura 60	Representação do modo de interação da molécula LCPVL604 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	116

Figura 61	Representação do modo de interação da molécula LCPVL480 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho os resíduos completamente distintos entre as DHODHs, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.....	117
Figura 62	Medidas da intensidade de fluorescência normalizadas em função da temperatura. As curvas de desnaturação térmica das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença de SNU (curva amarela), UNK (curva verde) e SNQ (curva vermelha) mostram uma estabilização significativa das enzimas quando comparadas com a curva controle, na ausência de ligantes (em azul).....	118
Figura 63	Estrutura química dos compostos que apresentam atividade anti-leishmania (a) QXOLT, (b) QXOLMT e (c) QXOLA2.....	120
Figura 64	Gráficos do monitoramento da formação de orotato em função do tempo. Medidas de formação de orotato para as enzimas (a) LmDHODH e (b) TcDHODH, na ausência de ligantes (em preto), e na presença dos inibidores qxolt (vermelho), qxolmt (azul) e qxola2 (verde). O perfil das curvas demonstram a inibição das enzimas na presença dos compostos devida a taxas baixíssimas de formação do orotato, quando comparada com a curva referência.....	120
Figura 65	Estrutura química dos compostos (a) 2-aminotiazol, (b) Isotiocianato de metila, (c) Fenil isotiocianato, (d) 4-Nitrofenil isotiocianato.....	121
Figura 66	Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC_{50} , para os experimentos realizados com as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH.....	124
Figura 67	Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC_{50} , para os experimentos realizados com as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH.....	127
Figura 68	Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC_{50} , para os experimentos realizados com as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH.....	129
Figura 69	Cristais da enzima TcDHODH-Y (13 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0, 2 mM DTT) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0.4 mm ao longo do eixo maior, estimada com o <i>loop</i> de coleta.....	132
Figura 70	Cristais da enzima TcDHODH-Y (10 mg/mL) obtidos nas condições: (a) 2,2 M sulfato de amônio e 0,2 M sulfato de potássio; (b) 2,2 M sulfato de amônio e 0,2 M nitrato de sódio e (c) 2,2 M sulfato de amônio e 0,2 M brometo de sódio.....	133
Figura 71	Interações entre o ácido (a) 5-Nitroorótico e (b) 5-Aminoorótico no sítio ativo da enzima LmDHODH. O mapa em azul representa o mapa de densidade eletrônica final 2Fo-Fc contornado a 1.0 σ . Em verde está representado o ligante ácido 5-Nitroorótico e em rosa o ligante ácido 5-Aminoorótico. Em cinza estão representados os resíduos que compõem o sítio ativo da enzima e que estão interagindo com os ligantes. O único resíduo que difere na interação entre ambos os compostos está indicado em amarelo, sendo que este interage com o ligante através mediado por uma molécula de água, que interage como grupo amino da posição 5 do anel pirimidínico. Figura gerada no programa Pymol.....	136

- Figura 72** Representação em "cartoon" da região do sítio ativo das estruturas cristalográficas dos complexos LmDHODH-LCPVL898 (estrutura representada em verde) e LmDHODH-LCPSP3027 (estrutura representada em rosa), e da estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH (representada em cinza) onde a alça catalítica (representado em vermelho) se encontra ordenado (PDB código 3TQ0). A inspeção dos mapas de densidade eletrônica para os complexos LmDHODH-LCPVL898 e LmDHODH-LCPSP3027 indicam que os resíduos Ser100 e Gln139, representados em azul, são os últimos resíduos ordenados que antes e após, respectivamente, a alça catalítica. A molécula de FMN está representada em amarelo. Figura gerada no programa Pymol..... 139
- Figura 73** Mapa de densidade eletrônica associado com os ligantes (A) SNU e (B) SNQ. Em verde está representado o mapa de omissão Fo-Fc (omit map) contornado a 2.5σ . O mapa em azul representa o mapa de densidade eletrônica final 2Fo-Fc contornado a 1.5σ . Os ligantes estão coloridos de acordo com o tipo de átomo: carbono em cinza e nitrogênio em azul. Figura gerada no programa Pymol..... 142
- Figura 74** Representação do sítio de interação dos compostos SNQ e SNU. Para ambos os complexos a subunidade A e B estão representadas em rosa e azul, respectivamente. Os resíduos envolvidos na interação cátion- π estão representados na forma de "sticks". Os ligantes estão apresentados na forma de "ball-and-stick" em cinza. Duas orientações são mostradas para um melhor entendimento das interações entre os ligantes e a enzima LmDHODH. Figura gerada no programa Pymol..... 143
- Figura 75** Sobreposição estrutural da enzima LmDHODH nativa (representada em cinza) com os complexos LmDHODH-SNQ (amarelo) e LmDHODH-SNU (rosa). Os ligantes estão representados como "ball and stick". Em ambos os complexos a cadeia lateral da His174 movimenta-se e faz uma das interações cátion- π com os ligantes. Consequentemente, a ligação de hidrogênio entre a cadeia lateral da His174/A e a cadeia lateral do Asp171/A na estrutura nativa (linhas pontilhadas amarelas) é perdida. Ao mesmo tempo, a cadeia lateral do Asp171/A move-se e inicia a formação de duas ligações de hidrogênio com o resíduo Gln139/B do outro monômero (linhas pontilhadas vermelhas). Esta figura representa as interações que ocorrem em uma das subunidades para cada complexo. No entanto, o mesmo cenário é observado para a outra subunidade. Figura gerada no programa Pymol... 145
- Figura 76** Representação de parte da estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH complexada com os ligantes (a) QXOLT, (b) QXOLMT e (c) QXOLA2, juntamente com os mapas de densidade eletrônica. Em verde está representado o mapa de omissão Fo-Fc (omit map) contornado a 3.0σ . O mapa em azul representa o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ . Figura gerada no programa Pymol..... 148
- Figura 77** Em azul está representado o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ , após o refinamento de um fragmento posicionado entre as cisteínas Cys131 e Cys150, no complexo LmDHODH-QXOLA2. Figura gerada no programa Pymol..... 148
- Figura 78** Mapa de densidade eletrônica final 2Fo-Fc contornado a 1.0σ associado com os ligantes (a) fenil isotiocianato e (b) 4-nitrofenil isotiocianato, complexados com a enzima LmDHODH. O mapa de densidade eletrônica contínuo mostra claramente a ligação covalente entre ambos os ligantes e a Cys150 da enzima. Os ligantes estão coloridos de acordo com o tipo de átomo: carbono em verde; nitrogênio em azul; oxigênio em vermelho; enxofre em amarelo. Figura gerada no programa Pymol..... 151
- Figura 79** Mecanismo catalítico da interação dos inibidores com a Cys150 da enzima LmDHODH..... 151

- Figura 80** Representação de um monômero da enzima LmDHODH complexada com as moléculas **(a)** fenil isotiocianato e **(b)** 4-nitrofenil isotiocianato. Os ligantes (representado em verde) interagem covalentemente com a CYS150. Ambos interagem no mesmo sítio, sítio S2, presente atrás da alça catalítica (representada em vermelho). Apesar de manter a mesma interação, os compostos estão posicionados de forma sutilmente diferente. Na comparação das figuras podemos notar claramente a diferença da posição adotada pela alça catalítica..... 152
- Figura 81** Representação na forma de superfície de van der Waals, em azul, de parte da enzima LmDHODH em complexo com os ligantes **(a)** LmDHODH-Fenil-isotiocianato e **(b)** LmDHODH-4-Nitrofenil-isotiocianato. A região que corresponde a alça catalítica de cada complexo está representada em amarelo. Os ligantes estão representados na forma de "sticks" em verde. A superfície de van der Waals referente à Cys150 também está representada em verde. Na imagem **(a)** é possível visualizar o FMN, representado na forma de "sticks" em amarelo, pois a alça catalítica do complexo (amarelo) encontra-se na posição aberta, voltado para o sítio S2. Na imagem **(b)** a conformação fechada da alça fecha a entrada do sítio S1, mostrando a acomodação do ligante atrás da alça..... 153
- Figura 82** Representação esquemática dos sítios encontrados nas enzimas DHODHs da classe 1A. Em azul e verde, estão representados os dois monômeros que compõem o dímero funcional. A localização de alguns resíduos chave estão identificadas na figura. Na figura **(a)** a alça catalítica (em rosa) encontra-se na posição fechada, assim o sítio S1 não tem acesso ao solvente. O acesso ao sítio S1 pelo sítio S2 ou S3 está bloqueado (orientação do bloqueio representada com setas vermelhas). Nesta situação, apenas os sítios S2, S3, S4 e S5 tem acesso ao solvente. Na figura **(b)** a alça catalítica (em rosa) encontra-se aberta, demonstrando que o acesso ao sítio S1 ocorre via sítio S3-S4 (seta preta). Nesta situação, todos os sítios passam a ter acesso ao solvente..... 154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores das identidades sequenciais, em porcentagem, entre as diferentes DHODHs. Valores calculados e cedidos gentilmente pela aluna de doutorado Patrícia Rosa Feliciano do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP. Grifado em verde: comparação entre organismos do gênero <i>Trypanosoma</i> ; em rosa: comparação entre organismos do gênero <i>Leishmania</i> ; em amarelo: comparação entre organismos do gênero <i>Trypanosoma</i> e <i>Leishmania</i> ; em ciano: comparação entre a bactéria <i>Lactococcus lactis</i> e organismos dos gêneros <i>Leishmania</i> e <i>Trypanosoma</i> ; em azul escuro: comparação entre membros da classe 1 e 2; em vermelho: comparação entre membros da classe 2. Os códigos apresentados na tabela se referem: Tc-Y (TcDHODH-Y); Tc-T1(TcDHODH-T1); Tc-T2(TcDHODH-T2); Tc-CLB1(TcDHODH-CLB1); Tc-CLB2 (TcDHODH-CLB2); Tc-CLB3 (TcDHODH-CLB3); Tco (TCODHODH); Tb (TbDHODH); Lm (LmDHODH); Li (LiDHODH); Lmx (LmxDHODH); Lbr (LbrDHODH); Ld (LdDHODH); Li-A (LiDHODH-A); Hs (HsDHODH) e Ec (EcDHODH).....	23
Tabela 2 – Relação das estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados PDB das enzimas DHODH das diferentes classes, juntamente com as diferenças relacionadas às características estruturais, natureza do agente oxidante e cofator utilizado pela enzima de cada organismo.....	24
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene de interesse para a clonagem. As sequências de iniciação e terminação de transcrição do gene de interesse estão em negrito. Os sítios de restrição estão sublinhados e correspondem as enzimas <i>NcoI</i> (direto) e <i>NotI</i> (reverso).....	42
Tabela 4 – Reações de digestão do produto de PCR e vetor pET28a(+) com as enzimas de restrição <i>NcoI</i> e <i>NotI</i>	43
Tabela 5 – Reações de ligação do produto de PCR e vetor pET28a(+) digeridos com as enzimas de restrição <i>NcoI</i> e <i>NotI</i>	44
Tabela 6 – Conteúdo das reações de digestão dos vetores pET22b-HsDHODH e pET28a(+) com as enzimas de restrição <i>NdeI</i> e <i>XhoI</i>	51
Tabela 7 – Conteúdo das reações de ligação do fragmento HsDHODH (proveniente do vetor pET22b-HsDHODH) e vetor pET28a(+) digeridos com as enzimas de restrição <i>XhoI</i> e <i>NdeI</i>	51
Tabela 8 – Lista dos resíduos presentes em cada um dos sítios selecionados (S1, S2, S3, S4, S5) nas enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y e os estruturalmente equivalentes na enzima humana. A numeração utilizada é referente à da enzima LmDHODH. Em amarelo estão selecionados os resíduos da enzima TcDHODH-Y que se diferem dos da enzima LmDHODH. Em verde estão grifados os resíduos da enzima humana que diferem de ambas as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH.....	100
Tabela 9 – Valores determinados da temperatura de desnaturação térmica das enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y na presença dos ligantes SNQ, SNU e UNK, estão sendo apresentados na coluna T _m . Os valores na variação da temperatura de desnaturação térmica das enzimas testadas na presença dos ligantes estão sendo apresentados na coluna ΔT _m	119
Tabela 10 – Porcentagem de inibição dos compostos da primeira geração identificados através da varredura virtual de ligantes em biblioteca de compostos, docados contra a enzima TcDHODH-Y. Nesta tabela encontra-se listado a identificação de cada composto, a empresa representante e as porcentagens de inibição que os respectivos compostos causaram nas enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração	

máxima de 11 μM do composto teste. As moléculas onde a inibição foi considerada significativa estão identificadas em amarelo.....	122
Tabela 11 – Porcentagem de inibição dos compostos da segunda geração identificados através da varredura virtual de ligantes em biblioteca de compostos, docados contra a enzima LmDHODH. Nesta tabela encontra-se listado a identificação de cada composto, a empresa representante e as porcentagens de inibição que os respectivos compostos causaram nas enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 11 μM do composto teste. As moléculas onde a inibição foi considerada significativa estão identificadas em amarelo.....	122
Tabela 12 – Valores de IC_{50} , em μM , calculados para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença dos compostos testados.....	125
Tabela 13 – Lista das moléculas identificadas através da varredura de ligantes em biblioteca de compostos por Termofluor. Nesta tabela encontra-se listado a identificação de cada composto, a empresa representante e as porcentagens de inibição que os respectivos compostos causaram nas enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 500 μM do composto teste.....	125
Tabela 14 – Lista dos compostos com atividade anti-leishmania já comprovado, testados contra as enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH. A tabela apresenta as porcentagens de inibição determinadas, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 11 μM do composto teste. Estão selecionados em amarelo os casos onde ocorreram inibições significativas.....	126
Tabela 15 – Valores de IC_{50} , em μM , calculados para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença dos compostos testados.....	127
Tabela 16 – Lista das pequenas moléculas testadas contra as enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH. A tabela apresenta as porcentagens de inibição determinadas, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 110 μM do composto teste. Estão selecionados em amarelo os casos onde ocorreram inibições significativas.....	128
Tabela 17 – Valores de IC_{50} , em μM , calculados para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença dos compostos testados.....	129
Tabela 18 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,437 \text{ \AA}$), a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado.....	134
Tabela 19 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,608 \text{ \AA}$), a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado.....	137
Tabela 20 – Ensaio de inibição enzimática em função do tempo para os compostos LCPSP3027 e LCPVL898 contra a enzima LmDHODH, mantendo-se fixa a concentração do inibidor igual a 11 μM . Em amarelo está selecionado o momento em que a porcentagem de inibição ultrapassa de 90%.....	138
Tabela 21 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,427 \text{ \AA}$), a 100 K, , coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado.....	141

-
- Tabela 22** – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,461$) para os complexos com QXOLT, QXOLMT a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado 147
- Tabela 23** – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,461$ e $1,305\text{\AA}$ para os complexos com Fenil isotiocianato e 4-nitrofenil isotiocianato, respectivamente), a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX2. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado 150
-

LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	<i>Center for Disease Control & Prevention</i>
DCIP	2,6 - Dicloroindofenol
DHO	Diidroorotato
DHODH	Diidroorotato desidrogenase
DL50	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
EcDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino terta acético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Flavina mononucleotídeo
HEPES	Ácido etanosulfônico 4-2 hidroxietil piperazina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HsDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Homo sapiens</i>
IC ₅₀	Concentração da substância que inibe 50% da atividade
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
K _m	Constante de Michaelis-Menten
K _i	Constante de inibição
LB	Luria-Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LIDHODH-A	Diidroorotato desidrogenase de <i>Lactococcus lactis</i> A
LbrDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania braziliensis</i>
LdDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania donovani</i>
LiDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania infantum</i>
LmDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania major</i>
LmxDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania mexicana</i>

LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
Log <i>P</i>	Logaritmo do coeficiente de partição em octanol/água
LV	Leishmaniose visceral
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCS	Simetria não cristalográfica
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético
ORO	Orotato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenoglicol
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
PfDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Plasmodium falciparum</i>
pI	Ponto isoelétrico
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TbDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma brucei</i>
TcDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TcDHODH-CLB1	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CLBrener gene 1
TcDHODH-CLB2	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CLBrener gene 2
TcDHODH-CLB3	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CLBrener gene 3
TcDHODH-T1	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Tulahuen gene 1
TcDHODH-T2	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Tulahuen gene 2
TcDHODH-T3	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Tulahuen gene 3
TcDHODH-Y	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y
TcDHODH-Y-SHis	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa Y sem cauda de histidina
TcoDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma congolense</i>
T _m	Temperatura de desnaturação
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
USP	Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

Consideradas sinais de subdesenvolvimento, pobreza e más condições de vida, as doenças tropicais negligenciadas (DTN) referem-se a um grande e complexo grupo de doenças que se desenvolvem em climas quentes e úmidos (clima tropical), e que são causadas por agentes infecciosos e parasitários (vírus, bactérias, protozoários e helmintos). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente 17 doenças são consideradas negligenciadas: Úlcera de Buruli, Doença de Chagas, Cisticercose, Dengue, Dracunculíase, Equinococose, Fasciolíase, Tripanossomíase africana, Leishmaniose, Lepra, Filaríase linfática, Oncocercíase, Raiva, Esquistossomose, Helmintíases, Tracoma e Boubá. Estas doenças são endêmicas em populações de baixa renda, vivendo, sobretudo, em países em desenvolvimento, localizados principalmente na África, Sudeste Asiático, América Latina e Caribe (www.who.int).

O adjetivo "negligenciadas" é consequência da falta de investimento, por parte dos órgãos públicos e privados, na prevenção, controle e busca de novas e eficientes terapias para o tratamento destas doenças. Apesar de mais de um bilhão de pessoas, aproximadamente um sexto da população mundial, sofrerem de uma ou mais doença tropical negligenciada, a maioria não dispõem de tratamentos adequados. Em geral, ainda há um grande grupo de DTN que estão sendo tratadas com medicamentos muito antigos, que apresentam problemas como baixa eficiência e sérios efeitos colaterais, consequência do surgimento da resistência aos fármacos administrados e da alta toxicidade (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; MALTEZOU, 2010). Em alguns casos particulares, onde tratamentos eficazes são existentes e os medicamentos são normalmente disponíveis a baixo custo ou doados por empresas farmacêuticas, a falha na aplicação de políticas públicas eficientes comprometem o controle das doenças, que muitas vezes poderiam ser prevenidas, tratadas e curadas e, no entanto, continuam a assolar comunidades pobres nos países em desenvolvimento (Eradicating infectious diseases in 2010, 2010; BAKER et al., 2010; GYAPONG et al., 2010; LIESE; ROSENBERG; SCHRATZ, 2010).

DTNs são responsáveis pela morte e incapacitação temporária ou permanente de milhões de pessoas, a maioria crianças, mulheres e minorias étnicas

que vivem em locais marginalizados. Consideradas um grave problema sócio-econômico, as DTNs afetam não só o indivíduo acometido pela doença, mas também sua família e comunidades inteiras, tendo efeitos importantes na redução da qualidade de vida, na perda de produtividade e consequente agravamento da pobreza.

Embora as doenças tropicais continuem sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, a falta de investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas terapias é ainda uma característica marcante. Somente 0,6% de todo o investimento mundial em saúde está alocado para todas as DTNs e como consequência, apenas 18 (1,2%) dos 1556 novos medicamentos registrados entre os anos de 1975 e 2004 foram desenvolvidos para doenças tropicais negligenciadas (CHIRAC; TORREELE, 2006). Ainda mais agravante, um estudo sobre o financiamento mundial para as DTNs revelou que menos de 5% deste orçamento foi investido no grupo das doenças consideradas extremamente negligenciadas, ou seja, doença do sono, leishmaniose visceral e doença de Chagas, embora mais de quinhentos milhões de pessoas sejam ameaçadas por estas três doenças (MORAN et al., 2009).

Diante deste quadro, fica evidente que as DTNs constituem um problema de saúde pública mundial e que novas políticas de controle, prevenção e investimento em pesquisa e desenvolvimento, tanto pelo setor público quanto privado, são fundamentais para a implementação de novas estratégias de diagnóstico e formas terapêuticas eficazes. Sob o ponto de vista econômico, o acesso da população pobre à terapia adequada às DTNs é uma ferramenta importante no combate à desigualdade social, tão marcante nos países em desenvolvimento. Sob o ponto de vista humano, é permitir que uma grande parcela da população mundial tenha direito a viver com dignidade.

1.2. DOENÇA DE CHAGAS

1.2.1. HISTÓRICO

Há mais de cem anos, 1909, no município de Lassance, Minas Gerais, o médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas identificou a doença por ele denominada *Tripanossomíase americana*, em termos de sua patologia e patogênese

(CHAGAS, 1909). Atualmente denominada doença de Chagas, em homenagem ao seu descobridor, a patologia é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, nome este atribuído por Chagas em homenagem ao seu orientador, Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909). O achado é considerado, desde então, um feito único na história da medicina, pelo fato do ciclo completo da moléstia ter sido descrito apenas por uma única pessoa, Carlos Chagas.

1.2.2. CICLO DE VIDA - *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do parasito *T. cruzi* (**Figura 1**) inclui a passagem obrigatória por hospedeiros de várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos hematófagos dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* pertencentes à família Triatomidae.

Figura 1: Ciclo de vida do parasito *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas. O ciclo se inicia com a picada do inseto vetor que libera a forma infectante tripomastigota metacíclica nas fezes ou na urina. Os parasitos se transformam em amastigotas nas células infectadas e se transformam em tripomastigotas sanguíneos e entram na corrente sanguínea. Durante a picada, o inseto vetor é contaminado com a forma tripomastigota sanguínea que se transforma em epimastigota no intestino do inseto. Imagem adaptada do CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

Nos vertebrados, o parasito circula no sangue e multiplica-se nos tecidos. Já no inseto vetor, o parasito multiplica-se no tubo digestivo e as formas infectantes são eliminadas em suas fezes e urina. O parasito *T. cruzi* se apresenta em três principais estágios de desenvolvimento: epimastigotas (forma não infectante ao homem que se reproduz no intestino do inseto vetor); amastigotas (forma encontrada dentro das células de pessoas infectadas); tripomastigotas sanguíneos (forma encontrada no sangue de pessoas infectadas) e tripomastigotas metacíclicos (forma infectante ao homem encontrada junto às fezes do inseto vetor).

1.2.3. TRANSMISSÃO

A forma mais comum de transmissão do protozoário *T. cruzi* ao homem se dá pelas fezes infectadas de insetos triatomíneos. Existem mais de cem espécies de triatomíneos capazes de transmitir o *T. cruzi*, porém a espécie mais comum refere-se ao inseto vetor *Triatoma infestans* (**Figura 2**) (CLAYTON, 2010). Considerando que a transmissão da infecção é feita pelas fezes e pela urina dos triatomíneos, o tempo de defecação é de grande importância. Assim, aqueles triatomíneos que defecam imediatamente após o repasto ou durante a picada, como no caso do *Triatoma infestans*, depositando as fezes no local, têm uma grande importância na transmissão. Esses insetos vivem geralmente em frestas de casas mal construídas (casas de pau a pique) situadas, principalmente, em áreas rurais ou suburbanas. Normalmente eles se escondem durante o dia e tornam-se ativos durante a noite, quando se alimentam de sangue. Estes percevejos hematófagos costumam picar a área da face, por estas estarem mais expostas e, por isso, são conhecidos popularmente como barbeiros.

Figura 2: Inseto *Triatoma infestans*, barbeiro, responsável pela transmissão vetorial da doença de Chagas.

Embora inicialmente a doença de Chagas fosse considerada predominantemente rural, a migração da população para áreas urbanas mudou a

característica epidemiológica desta doença e a transformou em uma infecção do tipo urbana (COURA; VINAS, 2010; PETHERICK, 2010). Assim, novas e importantes formas de transmissão foram identificadas, como por transfusão sanguínea, via congênita, via órgãos transplantados, acidentes laboratoriais e recentemente a transmissão via oral (ALARCÓN DE NOYA et al., 2010). Segundo dados da OMS, os números de infecção nos bancos de sangue em algumas cidades do continente variam de 1,7 a 53%, mostrando que a infecção de Chagas por sangue contaminado é maior que a infecção de AIDS e Hepatites B e C. Desta forma, a transmissão por transfusão sanguínea passa a ser considerada bastante preocupante (GRANT et al., 1989; HAGAR; RAHIMTOOLA, 1991; LEIBY et al., 1997). No caso da recente forma de transmissão identificada, via oral, o problema se agrava, pois geralmente quando essa transmissão ocorre, a quantidade de parasito ingerida é muito grande, potencializando os sintomas da fase inicial da infecção, podendo levar o paciente a óbito (MILES, 2010). No Brasil, a transmissão oral em cidades em torno da Amazônia é uma preocupação crescente, pois entre 1968 e 2005 (total de 37 anos) apenas 440 casos de transmissão adquirida por via oral pelo *T. cruzi* foram identificados, já de 2005 a 2007 (total de 2 anos) foram identificados 330 casos.

Esta forma de transmissão da doença não é exclusividade do norte do Brasil. Em 2005, a questão chamou a atenção nacional, devido a um surto ocorrido em um estado rico do Brasil, sul de Santa Catarina, onde cinco pessoas morreram devido à infecção por *T. cruzi*, após a ingestão de caldo de cana-de-açúcar contaminado (PETHERICK, 2010). Em Caracas, Venezuela, um surto semelhante ao de Santa Catarina foi responsável pela contaminação de 75 crianças, que apresentaram sintomas agudos da infecção, onde uma delas chegou a óbito, após a ingestão de suco de goiaba contaminado com fezes de *Triatoma* contendo parasitos (ALARCÓN DE NOYA et al., 2010).

1.2.4. PATOGENIA

Existem dois estágios da doença: a **fase aguda** que aparece logo após a infecção, e a **fase crônica** que aparece depois de um longo período sem a manifestação da doença, chamado de período de latência, período este que pode durar vários anos. A **fase crônica** é caracterizada por três diferentes formas da doença: a) forma cardíaca, com miocardite crônica, insuficiência cardíaca e

eventualmente morte súbita, por arritmia cardíaca; b) forma digestiva, com megaesôfago e megacólon (aumento exagerado do esôfago ou cólon); c) formas mistas, com cardiopatia e o aumento exagerado do esôfago ou cólon simultaneamente. O desenvolvimento da doença para essas diferentes formas podem levar o paciente chagásico à morte. A **fase aguda** é caracterizada pela presença de febre, conjuntivite unilateral (sinal de Romanã), adenomegalia, hepaesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite (CHAGAS, 1916). Na fase aguda a doença pode ser fatal em até 10% dos casos graves, geralmente nos que desenvolvem meningoencefalite, principalmente em crianças de até dois anos de idade (CHAGAS, 1916).

1.2.5. DISTRIBUIÇÃO

A distribuição geográfica do mal de Chagas engloba desde o México até o sul da Argentina (**Figura 3**). Estima-se que 10 a 12 milhões de pessoas estão infectadas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. No entanto, nas últimas décadas tem sido também detectada nos Estados Unidos, Canadá, muitos países europeus e alguns países do Pacífico Ocidental. Este fato é devido, principalmente, à mobilidade populacional entre a América Latina e o restante do mundo e, também, como resultado de infecção causada por transfusões sanguíneas (GRANT et al., 1989; HAGAR; RAHIMTOOLA, 1991; LEIBY et al., 1997).

O parasito *T. cruzi* pode viajar com o movimento populacional de países endêmicos para não endêmicos. Assim, o mal de Chagas começa a se tornar uma doença de interesse mundial, pois estima-se que, além de aproximadamente 10 milhões de pessoas contaminadas na América Latina, existem mais de 300.000 pessoas infectadas com *T. cruzi* nos Estados Unidos, 5.500 no Canadá, 80.000 na Europa e na região ocidental do Pacífico, 3.000 no Japão e 1.500 na Austrália (COURA; VINAS, 2010). Além disso, segundo a Organização Mundial de Saúde, mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de contrair a doença de Chagas.

Figura 3: Número de casos e distribuição da infecção por *Trypanosoma cruzi*, baseados em estimativas oficiais e do status da transmissão vetorial, no mundo todo, entre 2006-2009. Imagem adaptada da OMS.

1.2.6. PREVENÇÃO E TRATAMENTO

A transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* foi quase que totalmente erradicada no Brasil, resultado de um programa eficiente de erradicação do inseto vetor que se iniciou em meados de 1950 (PETHERICK, 2010). No entanto, o país ainda possui cerca de três milhões de pessoas infectadas e, além disso, nem todos os países endêmicos, principalmente os mais pobres, conseguiram efetuar com sucesso programas de erradicação. Mesmo com os grandes avanços no controle da transmissão do parasito via transfusão sanguínea e/ou através das fezes do inseto vetor, realizados em partes da América do Sul (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; GURTNER et al., 2007; PETHERICK, 2010), quimioterapias efetivas ainda são extremamente necessárias para tratar as milhares de pessoas já infectadas.

Os fármacos benznidazol (Rochagan®) (**Figura 4(a)**) e o nifurtimox (Lampit®) (**Figura 4(b)**) foram introduzidos a mais de 40 anos no mercado e embora

apresentando índices de cura muito baixos, ainda são os únicos fármacos utilizados para o tratamento da fase aguda e recente da infecção chagásica humana. Ambos os fármacos falham no tratamento do mal de Chagas, pois apresentam eficiência limitada para tratar a fase crônica da infecção, requerem um longo período de tratamento (60 dias para o benznidazol e mais de 90 dias para o nifurtimox) e apresentam graves efeitos colaterais, incluindo rachaduras na pele, náusea e insuficiência renal e hepática (COURA; DE CASTRO, 2002). O uso do nifurtimox também pode causar convulsões e outros distúrbios do sistema nervoso. Além destes problemas, muitas comunidades rurais pobres em países endêmicos também não possuem infraestrutura suficiente para dar suporte ao tratamento completo dos pacientes, diminuindo a eficiência dos fármacos e aumentando o surgimento de cepas resistentes à quimioterapia. A eficácia desses fármacos varia de acordo com a região geográfica, provavelmente devido a diferenças na susceptibilidade ao fármaco entre as diferentes cepas de *T. cruzi*, dificultando ainda mais o tratamento do mal de Chagas (MARTINEZ-DIAZ, et al., 2001).

Figura 4: Representação da estrutura química dos compostos **(a)** benznidazol e **(b)** nifurtimox.

A doença de Chagas continua a ser um grave problema de saúde pública na América Latina (SOARES; SANTOS, 2009) e as preocupações sobre a resistência ao fármaco, a elevada toxicidade e a baixa eficácia destes, em especial durante a fase crônica da infecção, encoraja a busca de novos medicamentos (COURA, 2007).

1.3. LEISHMANIOSE

1.3.1. HISTÓRICO

O nome do gênero *Leishmania* foi criado pelo médico inglês Ronald Ross em honra ao militar William Boog Leishman, que identificou em 1903 o protozoário causador do calazar ou febre dum-dum, um dos tipos de leishmaniose (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). A Leishmaniose é causada pela contaminação de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, pertencentes à família dos tripanossomatídeos. Aproximadamente vinte e uma espécies de protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis pelas diferentes patologias de leishmaniose.

1.3.2. CICLO DE VIDA - *Leishmania spp*

O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* (**Figura 5**) inclui a passagem por hospedeiros de várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*. O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* é constituído por um estágio promastigota flagelado extracelular e um estágio amastigota intracelular. O ciclo é iniciado com a alimentação do inseto vetor de sangue de mamífero infectado, como cachorros, roedores e humanos. No intestino do inseto, as formas promastigotas proliferam e passam por vários estágios de desenvolvimento e então são transferidas ao homem no ato da picada. No mamífero hospedeiro, as formas promastigotas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos no local da infecção, onde passam por diferenciação para o estado amastigota. Assim, os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas que infectam outros macrófagos. O inseto, ao picar um mamífero infectado, ingere os macrófagos contendo formas amastigotas do parasito, que no intestino do inseto se diferenciam em promastigotas (LEIFSO et al., 2007).

Figura 5: Ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania* spp, agente causador dos diferentes tipos de Leishmaniose. Imagem retirada e adaptada do CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/>).

1.3.3. TRANSMISSÃO

Cerca de trinta espécies de insetos flebotomíneos são responsáveis por transmitir a leishmaniose (HERWALDT, 1999). Estes insetos têm preferência por viver em locais com muita umidade e são vistos geralmente nas horas sem luminosidade. Normalmente são encontrados em ambientes protegidos como fendas de pedras, buracos no solo, grutas de animais, e também em ambientes modificados pela ação humana, tais como: abrigos de animais domésticos (canis, galinheiros, chiqueiros, currais, entre outros). Apenas as fêmeas de flebotomíneos necessitam do sangue dos animais vertebrados, que é necessário para que ocorra a maturação dos seus ovos. Por esta razão, só elas são hematófagas, e consequentemente, estão envolvidas na transmissão da leishmaniose aos humanos e animais. Um exemplo é a transmissão dos parasitos ao homem pela picada de um inseto fêmea do gênero *Lutzomyia*, conhecido popularmente como **birigui** ou **mosquito-palha**.

A leishmaniose se tornou uma zoonose com grande impacto para a saúde pública, apresentando um aumento de números de casos registrados em cães e humanos nos últimos anos. A doença não é mais de caráter exclusivamente rural, pois o crescimento desordenado das cidades, tem resultado em um processo de

urbanização da doença. O convívio cada vez mais próximo entre homens e cães (que podem atuar como "reservatórios" do parasito) e o aumento da quantidade do vetor, têm sido apontados como fatores responsáveis pelas condições adequadas para ocorrência da doença na área urbana. Existem outras formas de transmissão, porém mais raras, como através de transfusão sanguínea e acidentes laboratoriais (MAGILL, 1995; HERWALDT, 2001).

Figura 6: Inseto *Lutzomyia longipalpis*, mosquito-palha, responsável pela transmissão vetorial da Leishmaniose.

1.3.4. PATOGENIA

As diferentes formas clínicas de leishmaniose são: **leishmaniose cutânea (LC)**, a forma mais comum da doença, que provoca ulcerações na pele deixando cicatrizes permanentes; **leishmaniose muco-cutânea (LMC)**, que 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, que causa lesões crônicas parecidas com a lepra, não cicatrizam espontaneamente e voltam após tratamento; e **leishmaniose visceral (LV)**, também chamada calazar, que é a forma mais preocupante da doença, sendo fatal se não tratada, causa hipertrofia do baço e fígado, febre, anemia e perda de peso (HERWALDT, 1999). 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**.

1.3.5. DISTRIBUIÇÃO

As leishmanioses são endêmicas em 88 países distribuídos em quatro continentes (África, Ásia, Europa e América do Norte e do Sul). De acordo com a

OMS, estima-se que aproximadamente 14 milhões de pessoas estão contaminadas com a doença e cerca de 350 milhões de pessoas correm o risco de contraírem a mesma. A distribuição mundial das duas formas clínicas da doença, **LC (Figura 7)** e **LV (Figura 8)** se dão de forma diferente. Segundo a OMS surgem 500.000 novos casos por ano de **LV** (90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão) e 1,5 milhões de casos de **LC** (90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria). Além disso, 90% dos casos de **LMC** ocorrerem no Brasil, Bolívia e Peru. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, registram-se anualmente cerca de 3 mil casos de **LV** distribuídos em 19 estados das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, com 90% dos casos concentrados no Nordeste do país. Além disso, cerca de 30 a 35 mil casos anuais de **LC**, conhecida popularmente como ferida brava, são relatados, principalmente em moradores de áreas rurais ou próximas de matas.

Figura 7: Número e distribuição de casos de **LC**, no mundo todo, entre 2005-2009. Imagem adaptada da OMS.

Segundo a OMS, a incidência de **LC** no Brasil aumentou de 21.000 casos em 1998 para 30.550 casos em 2000. Uma tendência similar foi reportada para Cabul, Afeganistão, onde o número de casos passou drasticamente de 14.200 em 1994 para 200.000 em 1999.

Figura 8: Número e distribuição de casos de **LV**, no mundo todo, entre 2005-2009. Imagem adaptada da OMS.

1.3.6. TRATAMENTO

O tratamento das leishmanioses, **LV** e **LC**, se dá através do uso dos fármacos derivados de antimônios pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (**Figura 9(a)**) e o antimoniato-N-metil glucamina (Glucantime[®]) (**Figura 9(b)**) (CROFT; YARDLEY, 2002; CROFT; COOMBS, 2003; CROFT et al., 2005). O Glucantime[®] é distribuído gratuitamente no Brasil pelo Ministério da Saúde. O mecanismo de ação desses fármacos ainda não é totalmente elucidado, mas sabe-se que eles atuam nas formas amastigotas do parasito, através da inibição da via glicolítica e a via oxidativa de ácidos graxos. Apesar da elevada eficácia desses

fármacos, eles são cardiotóxicos e, além disso, a sua administração tem dado origem ao aparecimento de parasitos resistentes (CROFT, 2001).

Figura 9: Representação da estrutura química dos compostos **(a)** estibogluconato de sódio e **(b)** antimoniato-N-metil glucamina.

Outros fármacos têm sido utilizados para o tratamento da leishmaniose, como a pentamidina (Pentacarinat[®]) (**Figura 10 (a)**) e anfotericina B (Fungisone[®]) (**Figura 10(b)**). A anfotericina B é o fármaco mais eficaz, atuando nas formas promastigotas e amastigotas do parasito. Mas apresentam limitações, como necessidade de tratamentos prolongados, diversos efeitos colaterais e custos elevados.

Figura 10: Representação da estrutura química dos compostos **(a)** pentamidina e **(b)** anfotericina B.

Desta forma, diante da limitada forma de tratamento para as diferentes formas da leishmaniose, assim como pra doença de Chagas, se faz necessária a busca por novas formas de tratamento.

1.4. PLANEJAMENTO RACIONAL DE FÁRMACOS

A revolução da biologia nas últimas décadas tem resultado em grandes oportunidades para a descoberta de novos fármacos. As sequências do genoma humano e de muitos microrganismos patogênicos têm impulsionado a pesquisa com a identificação de novos genes com potencial interesse farmacológico. A função de parte das proteínas codificadas por estes genes pode ser predita pela similaridade a outros genes, mas grande parte destas sequências genômicas codifica cadeias polipeptídicas com funções desconhecidas. A proteômica, neste âmbito, tem papel fundamental na elucidação da função destas proteínas, principalmente através da identificação dos produtos protéicos codificados pelos genes, determinação de sua estrutura tridimensional e caracterização de domínios funcionais, corroborados por outras abordagens como técnicas de DNA recombinante, bioquímicas, espectroscópicas, dentre outras.

Da mesma forma que a função de uma macromolécula biológica depende intrinsecamente de sua estrutura tridimensional, a ação farmacológica de uma molécula depende de sua complementaridade estrutural, química e estérica, em relação ao seu receptor molecular. Dessa forma, o estado da arte da descoberta de novos fármacos envolve a metodologia denominada planejamento de fármacos ou planejamento de fármacos baseado em estrutura de proteínas (BLUNDELL, 1996; ANDERSON, 2003; SUN et al., 2003; HUBBARD, 2011).

O desenho de fármacos baseado em estrutura tornou-se uma tecnologia altamente desenvolvida e utilizada nas maiores empresas farmacêuticas. O preceito básico desta técnica explora a informação estrutural do alvo molecular, normalmente uma proteína, para a busca dirigida de ligantes com grande especificidade pelo receptor, de forma a maximizar a sua atividade inibitória e como consequência, minimizar efeitos colaterais causados pela interação inespecífica destes compostos com outros alvos biológicos. É com esta idéia em mente que o desenho racional de

fármacos baseado em estrutura, tem-se tornado uma importante ferramenta biotecnológica na busca de novos fármacos e vacinas.

A busca por novos fármacos pode ser resumida como composta por três principais etapas: descoberta, otimização e desenvolvimento (WERMUTH, 2003). Após a identificação e validação de um determinado alvo terapêutico, inicia-se a busca/descoberta de substâncias bioativas, seguindo-se da otimização desses compostos de partida. É na etapa de otimização dos ligantes que é realizado o aperfeiçoamento da estrutura, de forma a aumentar a potência, a seletividade e a diminuição da toxicidade das mesmas, até se tornarem compostos líderes.

Com o aperfeiçoamento da informática foi possível unir a química e a informática gerando uma nova área a quimioinformática (JORGENSEN, 2004). Os métodos em quimioinformática estabelecem-se pelo gerenciamento, manipulação e otimização das propriedades úteis no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos (OPREA et al., 2007). Eles são fundamentais para (i) a representação e comunicação de dados, (ii) o planejamento e organização de banco de dados (MILLER, 2002), (iii) a predição da estrutura e propriedade, (iv) a caracterização das propriedades de fármaco ou protótipo (substância matriz ou líder), (v) o estabelecimento da similaridade e diversidade molecular, (vi) o planejamento e otimização de coleções de compostos, (vii) o ensaio virtual e busca em banco de dados, (viii) a classificação e seleção de compostos, (ix) a geração de relações qualitativas estrutura-atividade e estrutura-propriedade, (x) a geração de modelos estatísticos e descritores (quimiometria) e (xi) a predição de características de compostos *in vitro* e *in vivo*.

Dentre os métodos em quimioinformática citados, destaca-se a busca virtual de moléculas bioativas (ALVAREZ, 2004; BLEICHER et al., 2003). Esta técnica tem sido utilizada como uma importante ferramenta na busca de novas moléculas candidatas a fármacos. Isto porque, o ensaio virtual diminui drasticamente o tempo gasto para analisar bancos de dados reais e/ou virtuais, através do uso de computadores e softwares de alto desempenho. Além disso, o ensaio virtual ajuda a priorizar os compostos a serem submetidos aos ensaios *in vitro*, que demandam elevados custo e tempo.

Historicamente, existem duas formas de planejamento utilizadas no ensaio virtual: o planejamento baseado na estrutura do ligante e o planejamento

baseado na estrutura do receptor (ALVAREZ, 2004). O planejamento baseado na estrutura do ligante tem como objetivo, identificar moléculas similares (farmacofóricas) às moléculas já conhecidas, mas que sejam capazes de interagir com o alvo molecular de uma forma mais eficiente. Essa estratégia limita a diversidade química das moléculas candidatas, já que elas são influenciadas pelas propriedades dos ligantes conhecidos. O planejamento baseado na estrutura do receptor, por outro lado, tem o objetivo de explorar o reconhecimento molecular entre o ligante e a macromolécula para selecionar compostos que se liguem eficazmente ao sítio promissor do alvo (GHOSH et al., 2006). A docagem molecular baseada na estrutura do receptor pode ser definida como uma tentativa de prever a conformação e a orientação do ligante frente ao receptor (BROOIJMANS; KUNTZ, 2003). Desta forma, a informação tridimensional detalhada do receptor é fundamental. Informações estruturais podem ser obtidas através do uso de técnicas físicas como cristalografia de raios-X ou espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

Atualmente, os projetos de sequenciamento genômico e genoma estrutural constituem ferramentas importantes para a descoberta de novos alvos terapêuticos, proporcionando assim, novas estratégias para o planejamento de compostos antiparasitários. Sendo hoje uma abordagem comum contra as mais diferentes doenças, a técnica de planejamento de fármacos e vacinas baseados em estrutura tem sido amplamente aplicada no combate à doença de Chagas e Leishmanioses. Vários alvos moleculares relevantes para os parasitos causadores destas doenças foram identificados, como tripanotona redutase (FAIRLAMB et al., 1985), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (JURADO; MACHIN; URBINA, 1996), diidrofolato sintetase (LAU et al., 2001), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (PAVÃO et al., 2002), diidroorotato desidrogenase (ANNOURA et al., 2005), dentre inúmeros outros. Dentre os inúmeros alvos moleculares já identificados, a enzima diidroorotato desidrogenase foi utilizada neste trabalho como alvo para o planejamento de fármacos com atividade antiparasitária baseado na estrutura do receptor molecular.

1.5. DIIDROOROTATO DESIDROGENASE

1.5.1. VIA *DE NOVO* DE NUCLEOTÍDEOS DE PIRIMIDINAS

Nucleotídeos de pirimidina são essenciais não somente para a síntese de DNA e RNA, mas também para a biossíntese de lipídeos de membrana, glicosilação de proteínas e outros eventos que ocorrem no metabolismo celular (LOFFLER et al., 1997). Embora algumas células sejam capazes de produzir a quantidade necessária de nucleotídeos de pirimidina, reciclando nucleosídeos e bases através das vias de salvação, outras, especialmente durante o período de proliferação celular, não conseguem reciclar a quantidade necessária ou não possuem a via de salvação. Nesta situação, as células passam a depender, portanto, da síntese de nucleotídeos através de outra via metabólica, a via *de novo*, altamente conservada em eucariotos e procariotos. A via *de novo* é composta de seis enzimas: carbamil fosfato sintetase (CPSase), aspartato transcarbamilase, diidroorotase, diidroorotato desidrogenase, orotato fosforibosil transferase e orotodilato descarboxilase (**Figura 11**) (STRYER, 1995; NELSON; COX, 2002). No quarto passo da via *de novo* atua a enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), responsável pela conversão da molécula L-diidroorotato (DHO) em orotato.

A reação catalítica promovida pela enzima DHODH corresponde à única etapa de oxidação-redução na síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina (JONES, 1980). Durante a catálise, DHODH utiliza a flavina mononucleotídeo (FMN) como coenzima, para, na primeira parte da reação, promover a oxidação do substrato DHO enquanto FMN é reduzido (FMNH₂). Na segunda etapa da reação, FMN é reoxidado (FMNH₂ é convertido em FMN) através do auxílio de um segundo substrato, um agente oxidante, cuja natureza varia entre as enzimas DHODHs de diferentes origens biológicas.

Figura 11: Etapas da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas. Figura adaptada de Nelson e Cox (2002).

1.5.2. CLASSIFICAÇÃO DAS ENZIMAS DHODHS

De acordo com as características estruturais, localização celular, natureza do segundo substrato e origem biológica, as enzimas DHODHS são atualmente divididas em duas classes 1 e 2, sendo a classe 1 subdividida em classe 1A e 1B. As enzimas da classe 1 são encontradas no citosol, enquanto que as enzimas pertencentes à classe 2 são encontradas associadas às membranas citosólicas ou mitocondrial (LIU et al., 2000; NORAGER et al., 2002; COUTO et al., 2008). Devido a esta associação com a membrana, todos os membros da classe 2 apresentam

uma extensão na região N-terminal, denominada domínio de membrana, que permite a interação dessas enzimas com a membrana. As enzimas pertencentes à classe 1 são encontradas, em bactérias do tipo Gram-positivas, fungos anaeróbicos e em eucariotos inferiores, como no caso dos tripanossomatídeos. Já as enzimas pertencentes à classe 2 são encontradas em eucariotos e alguns procariotos como bactérias do tipo Gram-negativas. A divisão das DHODHs em duas classes correlaciona também a preferência dessas enzimas por diferentes receptores de elétrons e ao estado oligomérico. As enzimas da classe 1A são homodiméricas e utilizam como agente oxidante moléculas de oxigênio ou moléculas solúveis em água, como fumarato, que oxidam FMNH₂ para a regeneração de FMN. DHODHs da classe 1B são enzimas heterotetraméricas, que utilizam NAD⁺ como agente oxidante e contém não somente o FMN, mas também uma molécula flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e um cluster [2Fe-2S] (NIELSEN; ANDERSEN; JENSEN, 1996; ROWLAND et al., 2000). Enzimas da classe 1B aparentam prevalecer em bactérias Gram-positivas, onde algumas expressam tanto a forma 1A quanto a forma 1B. Em contraste, a forma 1A aparenta ser a única forma em alguns eucariotos, como em espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*.

As enzimas da classe 2 são proteínas monoméricas e utilizam, como receptores de elétrons, moléculas de caráter hidrofóbico. No caso da enzima humana, pertencente à classe 2, ubiquinona é o agente oxidante (JONES, 1980); (LIU et al., 2000). Além disso, o resíduo responsável pela desprotonação do DHO, ou seja, a base catalítica da reação, depende da classe na qual a enzima DHODH pertence, sendo uma cisteína para a classe 1 e uma serina para a classe 2.

1.5.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS ENZIMAS DHODHS

Em termos gerais, as enzimas DHODHs de ambas as classes apresentam uma estrutura terciária similar. Elas se enovelam em um motivo barril α/β , onde oito β -fitas estão rodeadas por oito α -hélices (domínio catalítico). Adicionalmente, as enzimas pertencentes à classe 2 apresentam um domínio extra ao domínio catalítico, denominado domínio de membrana que é formado por 2 α -hélices. Na base do barril são encontradas duas β -fitas 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 (**Figura 12**). Na parte superior do barril também é

encontrada uma alça, denominada alça catalítica, que atua como uma "tampa" do barril, região que compreende os resíduos Leu129 a Tyr142 (DHODH de *T. cruzi* cepa Y: TcDHODH-Y) e Val213 a Gly226 (DHODH humana: HsDHODH). A abertura e o fechamento desta alça é responsável pelo controle da entrada e saída do substrato e produto, respectivamente, no sítio catalítico, também conhecido como sítio pirimidínico.

Figura 12: Estrutura de um monômero da enzima **(a)** TcDHODH-Y (PDB código 3C3N) e estrutura da enzima **(b)** HsDHODH (PDB código 1D3G). Em azul claro estão representadas as β -fitas e em rosa as α -hélices. No caso da enzima humana, está representado em azul escuro as duas α -hélices que formam o domínio de membrana. O FMN presente em ambas as estruturas está representado em amarelo. A região representada em verde corresponde a alça catalítica de ambas as enzimas, situado no topo do barril α/β .

Embora a estrutura em barril α/β de membros da classe 2 das DHODHs se assemelhe com a estrutura de membros da classe 1, há uma grande diferença na estrutura primária entre as enzimas pertencentes às diferentes classes. A identidade sequencial entre membros das classes 1 e 2 é de aproximadamente 20%. Em particular, a identidade sequencial entre as DHODHs de tripanossomatídeos e a humana é de aproximadamente 25%. 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, possivelmente devido às diferenças no tipo e na composição das membranas onde as enzimas DHODHs se encontram ancoradas. Quando analisada a identidade sequencial entre membros da classe 1, verificamos que esta é maior que 50%, chegando a mais que 70% quando nossa busca é restrita às DHODHs de tripanossomatídeos. As DHODHs das diferentes espécies do gênero *Leishmania* compartilham identidade sequencial superior a 85%. Dentre as diferentes espécies do gênero *Trypanosoma* a identidade sequencial é maior que 75%, sendo maior que 89% quando comparada as diferentes espécies de *Trypanosoma cruzi* (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores das identidades sequenciais, em porcentagem, entre as diferentes DHODHs. Valores calculados e cedidos gentilmente pela aluna de doutorado Patrícia Rosa Feliciano do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da FCFRP-USP. Grifado em verde: comparação entre organismos do gênero *Trypanosoma*; em rosa: comparação entre organismos do gênero *Leishmania*; em amarelo: comparação entre organismos do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania*; em ciano: comparação entre a bactéria *Lactococcus lactis* e organismos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*; em azul escuro: comparação entre membros da classe 1 e 2; em vermelho: comparação entre membros da classe 2. Os códigos apresentados na tabela se referem: Tc-Y (TcDHODH-Y); Tc-T1(TcDHODH-T1); Tc-T2(TcDHODH-T2); Tc-CLB1(TcDHODH-CLB1); Tc-CLB2 (TcDHODH-CLB2); Tc-CLB3 (TcDHODH-CLB3); Tco (TCODHODH); Tb (TbDHODH); Lm (LmDHODH); Li (LiDHODH); Lmx (LmxDHODH); Lbr (LbrDHODH); Ld (LdDHODH); LI-A (LIDHODH-A); Hs (HsDHODH) e Ec (EcDHODH)

DHODHs	1															2		
	Tripanossomatídeos																	
	Gênero <i>Trypanosoma</i>									Gênero <i>Leishmania</i>								
	T c - Y	T c - T 1	T c - T 2	T c - T 3	T c - C L B 1	T c - C L B 2	T c - C L B 3	T c o	T b	L m	L i	L m x	L b r	L d	L I - A	H s	E c	
Tc-Y	---	98.7	99.7	98.7	98.7	98.7	99.7	75.7	79.6	75,4	76,0	76,7	73,5	76,0	54,8	24,4	17,7	
Tc-T1	98.7	---	98.4	98.1	98.1	100	98.4	76.4	79.6	75,4	75,7	76,4	73,2	75,7	55,1	24,5	19,1	
Tc-T2	99.7	98.4	---	98.4	98.4	98.4	100	75.7	79.6	75.4	76.0	76.7	73.5	76.0	54,8	24,4	19,0	
Tc-T3	98.7	98.1	98.4	---	100	98.1	98.4	75.9	79.7	75.2	75.9	76.5	74.0	75.9	54,8	24,4	19,1	
Tc-CLB1	98.7	98.1	98.4	100	---	98.1	98.4	75.9	79.7	75.2	75.9	76.5	74.0	75.9	54,6	24,4	18,0	
Tc-CLB2	98.7	100	98.4	98.1	98.1	---	98.4	76.4	79.6	75.1	75.7	76.4	73.5	75.7	55,0	24,5	18,1	
Tc-CLB3	99.7	98.4	100	98.4	98.4	98.4	---	75.7	79.6	75.4	76.0	76.7	73.5	76.0	54,6	24,4	18,0	
Tco	75.7	76.4	75.7	75.9	75.9	76.4	75.7	---	78.6	72.8	73.9	73.5	72.5	73.8	54,4	32,9	28,3	
Tb	79.6	79.6	79.6	79.7	79.7	79.6	79.6	78.6	---	72,8	74,1	73,2	74,4	73,9	53,5	26,9	20,5	
Lm	75,4	75,4	75,4	75,2	75,2	75,1	75,4	72,8	72,8	---	95,9	94,9	85,0	95,8	53,5	24,8	20,5	
Li	76,0	75,7	76,0	75,9	75,9	75,7	76,0	73,9	74,1	95,9	---	95,8	86,6	99,7	55,1	24,8	19,9	
Lmx	76,7	76,4	76,7	76,5	76,5	76,4	76,7	73,5	73,2	94,9	95,8	---	85,0	95,5	55,1	24,4	19,6	
Lbr	73,5	73,2	73,5	74,0	74,0	73,5	73,5	72,5	74,4	85,0	86,6	85,0	---	86,9	56,7	25,4	20,2	
Ld	76,0	75,7	76,0	75,9	75,9	75,7	76,0	73,8	73,9	95,8	99,7	95,5	86,9	---	55,1	24,8	20,3	
LI-A	54,8	55,1	54,8	54,8	54,6	55,0	54,6	54,4	53,5	53,5	55,1	55,1	56,7	55,1	---	25,2	24,2	
Hs	24,4	24,5	24,4	24,4	24,4	24,5	24,4	32,9	26,9	24,8	24,8	24,4	25,4	24,8	25,2	---	41,9	
Ec	17,7	19,1	19,0	19,1	18,0	18,1	18,0	28,3	20,5	20,5	19,9	19,6	20,2	20,3	24,2	41,9	---	

Atualmente, podemos encontrar no banco de dados Protein Data Bank (PDB) a estrutura tridimensional resolvida para enzimas DHODHs pertencentes às duas classes, conforme resumidas na **Tabela 2**. Em particular, as estruturas cristalográficas das enzimas DHODHs de *Leishmania major* (LmDHODH) e *Trypanosoma cruzi* cepa Y (TcDHODH-Y) foram resolvidas em nosso laboratório.

Tabela 2: Relação das estruturas cristalográficas depositadas no banco de dados PDB das enzimas DHODH das diferentes classes, juntamente com 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	<i>Trypanosoma cruzi</i> - cepa Y	FMN	Fumarato	Homodímero	3C3N [1]
	<i>Trypanosoma cruzi</i> - cepa Tulahuen (gene2)				2DJX* [2]
	<i>Trypanosoma brucei</i>				2B4G [3]
	<i>Leishmania major</i>				3GYE* [4]
	<i>Leishmania donovani</i>				3C61 [5]
	<i>Lactococcus lactis</i>				1DOR* [6]
	<i>Streptococcus mutans</i>				3OIX [7]
1B	<i>Lactococcus lactis</i>	FAD FMN [2Fe-2S]	NAD ⁺	Heterodímero	1EP1* [8]
2	<i>Homo sapiens</i>	FMN	Ubiquinona	Monômero	1D3G* [9]
	<i>Plasmodium falciparum</i>				1TV5* [10]
	<i>Rattus Rattus</i>				1UUM* [11]
	<i>Escherichia coli</i>				1F76 [12]

*Há mais de uma estrutura depositada no PDB relacionada a DHODH deste organismo. [1] (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008); [2] (INAOKA et al., 2008); [3] (ARAKAKI et al., 2008); [4] (CORDEIRO; FELICIANO; NONATO, 2006); [5] (dados não publicados); [6] (ROWLAND et al., 1998); [7] (LIU et al., 2011); [8] (ROWLAND et al., 2000); [9] (LIU et al., 2000); [10] (HURT; WIDOM; CLARDY, 2006); [11] (HANSEN et al., 2004); [12] (NORAGER et al., 2002).

As diferenças estruturais corroboradas com as diferenças funcionais entre as enzimas DHODHs das diferentes classes, as tornam um interessante alvo a ser explorado. Devida a alta identidade sequencial entre membros das DHODHs de tripanossomatídeos, moléculas bioativas seletivas contra a DHODH de um organismo podem ser exploradas para os demais. Além disso, a altíssima identidade sequencial entre espécies do mesmo gênero, por exemplo, espécies do gênero *Leishmania* e espécies do gênero *Trypanosoma*, sugerem que uma mesma molécula bioativa pode atuar contra organismos de todas as espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, podendo assim contribuir de forma concomitante para o tratamento das doenças de Chagas e diferentes formas de Leishmaniose.

1.5.4. MECANISMO CATALÍTICO DAS ENZIMAS DHODHS

A enzima DHODH segue a cinética de reação de Michaelis-Menten envolvendo multisubstratos, especificamente, o mecanismo de dupla troca ou ping-pong. Desta forma, o ciclo catalítico da enzima DHODH consiste de duas etapas de reação. Na primeira etapa reacional, a coenzima FMN é reduzida pelo DHO. Na segunda etapa, a coenzima FMN é oxidada por um agente oxidante, cuja natureza varia dentre as diferentes classes das DHODHs. Em todas as DHODHs, o DHO é convertido em orotato pela quebra de duas ligações C-H. Ambas as reações envolvem a desprotonação e a transferência de um hidreto.

Na primeira etapa reacional, durante a oxidação do DHO, um próton é removido do carbono C5 do DHO por uma base, enxofre da cadeia lateral da cisteína na classe 1A e o oxigênio da cadeia lateral da serina na classe 2, no qual é retransmitido para o solvente via uma molécula de água. No caso das enzimas da classe 2, a serina passa o próton do DHO para o solvente através de uma rede de transferência de próton. O resíduo Thr218 (numeração referente à enzima HsDHODH) e uma molécula de água formam a rede, na qual as ligações de hidrogênio são orientadas pela Phe149 (numeração referente a enzima HsDHODH) (MCDONALD; PALFEY, 2011). O hidrogênio ligado ao carbono C6 do DHO é transferido ao FMN como um hidreto, formando a primeira ligação N-H, com o átomo de nitrogênio N5 do anel isoaloxazina da coenzima FMN. Comparações estruturais entre as classes 1A e 2 da DHODHs sugerem que o mecanismo da primeira parte depende de dois resíduos de lisina (Lys45 e Lys166 - numeração de acordo com a

TcDHODH-Y; Lys44 e Lys165 - numeração de acordo com a LmDHODH; Lys100 e Lys254 - numeração de acordo com a HsDHODH) que são essenciais para a função catalítica (NORAGER et al., 2002). De acordo com a estrutura tridimensional, a posição destes resíduos de lisina é altamente conservada nas classes 1A e 2 das DHODHs. A transferência do hidreto ao FMN é favorecida devido à interação da cadeia lateral da Lys45 com o grupo carboxila da molécula de DHO. Já a Lys166 é responsável por balancear a carga negativa criada no anel isoaloxazina do FMN após a transferência do hidreto.

A oxidação do DHO a orotato poderia ocorrer via dois mecanismos. No primeiro, ambas as ligações C-H se rompem simultaneamente, e no segundo mecanismo, as ligações se rompem sequencialmente. Estudos realizados com as enzimas HsDHODH e EcDHODH, pertencentes a classe 2, sugerem que essas enzimas utilizam os dois mecanismos. Já a observação da enzima LIDHODH(A) sugere que a reação segue o primeiro mecanismo (rompimento simultâneo das ligações – eliminação bimolecular [E2]) (**Figura 13**) (FAGAN et al., 2007).

Figura 13: Sugestão do mecanismo da oxidação do DHO. A conversão do DHO a orotato ocorre via um simples estado de transição, no qual a cisteína catalítica, Cys132 no caso da enzima TcDHODH-Y, desprotona o DHO com a transferência de um hidreto ao FMN. Figura adaptada de FAGAN (2007).

Na segunda etapa reacional, ao contrário do substrato DHO, o substrato desta etapa difere entre as diferentes classes das DHODHs. No caso das enzimas da classe 1A, que utiliza fumarato como agente oxidante (TAKASHIMA et al., 2002), uma torção presente na ligação entre os carbonos C2 e C3 do fumarato quebra a uniformidade da distribuição de elétrons- π de sua ligação dupla conjugada, então uma separação de carga, representada por δ^- e δ^+ na **Figura 14**, é induzida. Esta separação de cargas parciais atua como um guia para a transferência de um hidreto ao carbono C3(δ^+) do fumarato, pelo nitrogênio N5 do FMN reduzido, e de um próton da cisteína catalítica ao carbono C2(δ^-). O próton da cisteína vem de uma molécula

de água próxima, através de uma rede de interações, que passa para o fumarato, transformando-o em succinato. Ao final desta etapa, o sítio fica pronto para a entrada de uma nova molécula do substrato DHO e um novo ciclo catalítico.

Figura 14: Mecanismo catalítico proposto para as enzimas DHODHs da classe 1A. Na primeira etapa ocorre a oxidação do DHO a orotato. Na segunda etapa ocorre a redução do fumarato a succinato. Os resíduos envolvidos estão descritos em fonte negrito, correspondente a enzima TcDHODH-Y (PDB código 3C3N), e itálico, correspondente a enzima LmDHODH (PDB código 3GZ3). Em azul estão representadas as numerações dos átomos de carbono e nitrogênio do orotato e FMN. Figura adaptada de INAOKA (2008).

Em relação às enzimas pertencentes à classe 2 das DHODHs, não existem dados precisos de como a ubiquinona promove a oxidação do FMN reduzido durante a segunda etapa reacional.

Apesar de a primeira vista o mecanismo da primeira etapa de reação parecer ser o mesmo entre as DHODHs das diferentes classes, existem diferenças no modo em que ocorre a oxidação do DHO a orotato. Além disso, a importância do resíduo cisteína, como base catalítica em membros da classe 1A, já foi investigada para a enzima LIDHODH-A, através da mutação deste resíduo por uma alanina e também por uma serina. Em ambos os mutantes a redução do FMN é muito lenta. Logo, apesar da serina atuar como base catalítica nas enzimas da classe 2, ela não possui a mesma eficiência quando está presente nas enzimas da classe 1A, fato este relacionado com a rede de transferência de próton, formada pelos resíduos

Phe149 e Thr218 (numeração referente à enzima HsDHODH) presentes nas enzimas da classe 2, rede esta não conservada nas enzimas da classe 1A, onde a Phe149 é substituída por uma Leu (72 em LmDHODH e 73 em TcDHODH-Y) e a Thr218 substituída por uma Val (134 em LmDHODH e 135 em TcDHODH-Y). Desta forma, fica também evidente a existência de diferenças entre o mecanismo catalítico da primeira etapa de reação das DHODHs das diferentes classes, demonstrando a possibilidade de obtenção de inibidores específicos para as enzimas DHODHs da classe 1A.

1.5.5. DHODHs DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Em organismos multicelulares, a produção dos nucleosídeos de pirimidina, e dos seus correspondentes nucleotídeos, pela via metabólica de salvação, satisfaz as necessidades de pirimidina sob circunstâncias normais. No entanto, células que crescem rapidamente e muitos parasitos, dependem da biossíntese *de novo* de pirimidinas para a síntese eficiente de precursores de ácidos nucléicos. Dentro deste contexto, existe um grande interesse em investigar inibidores de DHODH como agentes terapêuticos no tratamento de doenças que envolvem grande proliferação celular ou parasitárias. A inibição das DHODHs provoca uma diminuição da quantidade intracelular dos nucleotídeos uracila, citosina e timina, tornando as DHODHs atraentes alvos para o desenvolvimento de fármacos com atividade antiproliferativa e antiparasitária (FAIRBANKS et al., 1995).

A utilização da síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas pelo parasito *T. cruzi* foi inicialmente identificada através do sequenciamento de um fragmento de DNA genômico do parasito de aproximadamente 25 kbases (GAO et al., 1999). Da mesma forma, o sequenciamento dos genomas de *Leishmania major* Friedlin (IVENS et al., 2005) e *Trypanosoma brucei*, responsável pela tripanossomíase Africana (BERRIMAN, 2004) identificou a presença de todos os seis genes que codificam as seis proteínas envolvidas na via metabólica *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas, incluindo a enzima diidroorotato desidrogenase. Com a verificação da presença da via *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas nos diferentes tripanossomatídeos, iniciavam-se as evidências da importância desta via metabólica para estes organismos. Estudos posteriores mostraram que a via metabólica de síntese de nucleotídeos de pirimidinas é essencial para a sobrevivência da forma

tripomastigota do parasito *T. cruzi*, como validado através de experimentos de “*Knock out*” do gene que codifica a enzima TcDHODH (ANNOURA et al., 2005). Além do papel da DHODH na biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, TcDHODH também foi descrita como uma fumarato redutase solúvel que desempenha um papel importante no controle da concentração de fumarato/succinato na célula (TAKASHIMA et al., 2002). Em *Trypanossoma brucei*, através de ensaios de RNA interferência, também foi avaliada a importância da enzima DHODH. Nestes ensaios, foi verificado que a inibição única e exclusiva da via *de novo* de nucleotídeos de pirimidina em *Trypanosoma brucei* não é capaz de interferir na sobrevivência do parasito, sugerindo que este é capaz de suprir a falta de bases pirimidínicas através da utilização de vias de salvação. Este resultado não era completamente inesperado, uma vez que no sequenciamento do genoma de *T. brucei* foram identificadas algumas enzimas associadas com a via salvação de pirimidinas como, por exemplo, citidina deaminase (GeneDB Tb09.160.1680), uracil fosforibosiltransferase (GeneDB Tb927.4.3320) e timidina quinase (GeneDB Tb10.70.7270). A hipótese de que *T. brucei* poderia usufruir da via de salvação sugeria que uma estratégia quimioterápica eficiente e que baseia-se em privar as células de bases pirimidínicas dependia da inibição concomitante da via *de novo* de nucleotídeos de pirimidina e da via de salvação. Estas hipóteses foram comprovadas através da realização de experimentos de RNA interferência da enzima TbDHODH, associadas à utilização do composto 5-fluorouracil (5-FU), composto este previamente identificado como potente inibidor da salvação de pirimidinas pelo *T. brucei* (GUDIN et al., 2006). Estes experimentos demonstraram que as células do parasito dependem da produção de precursores de nucleotídeos de pirimidinas e são susceptíveis à inibição de ambas as vias de obtenção de bases pirimidínicas (ARAKAKI et al., 2008). Assim, para o caso específico do *T. brucei*, os experimentos sugerem que a combinação de um tratamento com o composto 5-FU e uma nova molécula que iniba especificadamente a enzima DHODH de *T. brucei*, poderá potencializar drasticamente a atividade do 5-FU no tratamento da infecção pelo parasito *T. brucei* (ARAKAKI, et al., 2008). Até o presente momento, não existe na literatura relatos que comprovem a relevância da via *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, ou mesmo da via de salvação, para as diferentes espécies do gênero *Leishmania*.

Neste trabalho, focamos as enzimas DHODHs de dois diferentes organismos pertencentes à família dos tripanossomatídeos, sendo estes o parasito *Trypanosoma cruzi* (cuja infecção causa a doença de Chagas) e o parasito *Leishmania major* (cuja infecção causa a leishmaniose cutânea). A enzima diidroorato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* cepa Y (TcDHODH-Y) contém 314 resíduos, $M_w=34.052$ Da, $pI = 5,6$ (<http://au.expasy.org>), enquanto que a diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major* (LmDHODH) contém 312 resíduos, $M_w=34.662$ Da, $pI = 5,7$ (<http://au.expasy.org>). Segundo suas estruturas primárias, estas proteínas são citosólicas, membros da classe 1 das DHODHs. A determinação da estrutura cristalográfica de ambas as enzimas foram realizadas em nosso laboratório (LCP-RP), permitindo a realização do planejamento de inibidores baseado em estrutura de alvos macromoleculares de grande relevância biológica.

A obtenção da estrutura tridimensional das DHODHs de diferentes classes tem nos permitido a identificação de diferenças estruturais e funcionais entre elas que estão sendo exploradas no planejamento de inibidores específicos, como uma importante ferramenta no planejamento de fármacos baseado em estrutura. A presença de diferenças tanto estruturais como funcionais entre as enzimas dos tripanossomatídeos, *T. cruzi* e *L. major*, e a homóloga humana as tornam alvos interessantes para a utilização da técnica de planejamento de inibidores baseado em estrutura. Além disso, devido a alta similaridade presente entre as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, que sugere um modo de ação bastante similar entre elas, possibilita a identificação de inibidores que poderão ter ação sobre as DHODHs de diferentes tripanossomatídeos.

1.5.6. INIBIDORES DAS ENZIMAS DHODHS

A enzima DHODH tem sido considerada o alvo promissor no desenvolvimento de fármacos com atividade antiinflamatória, imunossupressora, antiproliferativa e antiparasitária (HARDER; HABERKORN, 1989; CHEN et al., 1992; ITTARAT, et al., 1995; JOCKEL; WENDT; LOFFLER, 1998; CHRISTOPHERSON; LYONS; WILSON, 2002). O potencial terapêutico da inibição desta via metabólica, através da inibição específica da enzima DHODH, tem sido demonstrado por compostos como a molécula A771726 (**Figura 15(a)**), metabólito ativo da Leflunomida (ARAVA[®]), recentemente aprovado para o tratamento de artrite

reumática, que inibe a enzima DHODH humana (GOLDENBERG, 1999). O composto Brequinar (**Figura 15(b)**), também inibidor da enzima DHODH humana, tem sido testado como antineoplasmático (BURRIS et al., 1998). Já o composto Atavacona (Malarone[®]) (**Figura 15(c)**), inibidor da enzima DHODH de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) é atualmente prescrito como medicamento anti-malária. Além disso, recentemente a enzima PfDHODH foi classificada como o melhor alvo para o desenvolvimento de novos princípios ativos anti-malária, e uma nova geração de compostos que constituem novos inibidores seletivos da enzima PfDHODH já estão em fase de testes clínicos (COTERON et al., 2011).

Figura 15: Estrutura dos inibidores das enzimas DHODHs da classe 2. **(a)** A771726, **(b)** Brequinar e **(c)** Atavacona.

Nas enzimas DHODHs pertencentes à classe 1 a interação de ambos os substratos, DHO e fumarato, interagem exatamente no mesmo sítio, o sítio pirimidínico (INAOKA et al., 2008). Em contraste, nas enzimas DHODHs pertencentes à classe 2, o DHO interage no sítio pirimidínico, enquanto que a ubiquinona interage em um sítio adicional, de caráter hidrofóbico. Os inibidores das enzimas pertencentes à classe 2 das DHODHs foram planejados para interagir no sítio de interação da ubiquinona, bloqueando o acesso do agente oxidante ao sítio, e interferindo na reciclagem da enzima para novos ciclos catalíticos (**Figura 16(a)**). No entanto, estes inibidores, planejados para inibir a classe 2 das DHODHs são seletivos e não inibem as DHODHs pertencentes à classe 1. Estes resultados são esperados uma vez que o sítio de ligação desses compostos é exclusividade das

DHODH da classe 2 e não estão presentes nas enzimas da classe 1 das DHODH (**Figura16(b)**).

Figura 16: Representação da superfície da estrutura das enzimas **(a)** HsDHODH (PDB código 1D3G) e **(b)** LmDHODH (PDB código 3TQ0). O sítio ativo, também chamado de pirimidínico, está sendo representado em magenta. Neste sítio está localizado a molécula de FMN (em amarelo) e o produto, orotato, da primeira etapa catalítica (em verde). Na enzima humana, o domínio de membrana, representado em ciano, é responsável pela formação de um sítio adicional por onde o agente oxidante da classe 2 das DHODHs passa. Também chamado de sítio de interação da quinona, este sítio possui caráter hidrofóbico e não está presente na enzima LmDHODH. O inibidor Brequinar está mostrado em cinza situado no sítio de interação da quinona, bloqueando o acesso do agente oxidante a coenzima FMN.

O primeiro estudo focando a inibição de alguma enzima da classe 1A das DHODHs foi realizado com a enzima de *Lactococcus lactis* (LIDHODH-A) (PALFEY; BJÖRNBERG; JENSEN, 2001). Esta busca por inibidores comprovou a possibilidade da obtenção de inibidores específicos contra as enzimas pertencentes a classe 1 das DHODHs, interagindo no sítio pirimidínico, apesar da alta identidade sequencial mantida neste sítio para enzimas DHODHs de ambas as classes. Enquanto os compostos denominados 3,4-hidroxibenzoato (3,4-diOHB) e 3,5-hidroxibenzoato (3,5-diOHB) apresentaram atividade inibitória contra a enzima LIDHODH-A (classe 1A), o composto 3,4-diOHB inibiu fracamente a enzima HsDHODH e EcDHODH (ambas da classe 2) e o composto 3,5-diOHB não inibiu nenhuma das duas enzimas da classe 2 testadas.

Como podemos verificar na **Figura 17**, a interação dos compostos 3,4-diOHB e 3,5-diOHB no sítio pirimidínico, envolve praticamente os mesmos resíduos da interação do produto da reação, orotato. A não inibição das enzimas pertencentes à classe 2, pelo composto 3,5-diOHB, pode estar relacionada com a mudança de

um resíduo chave na interação deste composto com a enzima de LIDHODH-A, onde o resíduo Ser194 (LIDHODH-A) é trocado pelo resíduo Thr285 (HsDHODH). A inibição fraca apresentada pelo composto 3,4-diOHB, pode estar relacionada ao fato do grupamento OH do composto 3,4-diOHB na posição 3, estar em conflito estérico com o oxigênio da cadeia principal do resíduo Asn193 (LIDHODH). A acomodação do composto 3,4-diOHB no sítio pirimidínico envolve uma pequena modificação na conformação desta região da proteína. Sendo assim, as enzimas da classe 2 podem não apresentar a mesma facilidade para aderir a esta mudança conformacional, e este composto, portanto, passa a inibir fracamente enzimas pertencentes à classe 2 das DHODHs.

Figura 17: Mapa de interações dos compostos **(a)** 3,4-diOHB (PDB código 2BSL), **(b)** 3,5-diOHB (PDB código 2BX7) e **(c)** orotato (PDB código 2DOR) no sítio pirimidínico da enzima LIDHODH-A. Os resíduos com interações conservadas estão marcados com círculos da mesma cor. Os resíduos não conservados entre as enzimas DHODHs das diferentes classes estão marcados com asterisco. Figura gerada no programa PoseView (STIERAND; RAREY, 2007).

Apesar destes compostos não serem inibidores potentes da enzima LIDHODH-A, são apenas protótipos para o desenvolvimento de novos inibidores, estes resultados comprovaram, pela primeira vez, que moléculas interagindo no sítio pirimidínico, quase que completamente conservado entre as enzimas DHODHs das diferentes classes, podem ser seletivas desde que exploradas as pequenas modificações presentes entre ambas as classes.

Devido à necessidade de quimioterapias eficientes para o tratamento das doenças tropicais negligenciadas, principalmente para aquelas consideradas extremamente negligenciadas como o mal de Chagas e a Leishmaniose, e a identificação de importantes alvos terapêuticos, como a enzima diidroorotato desidrogenase, nos motivou a entrar como mais um aliado na luta pelo combate à doença de Chagas e a Leishmaniose. Em nossa busca, focamos a inibição da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas, através da inibição seletiva das enzimas diidroorotato desidrogenase de tripanossomatídeos.

A proposta deste trabalho foi a de nos inserirmos como mais um aliado na luta pelo combate à doença de Chagas e a Leishmaniose, focando a busca de inibidores da biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas dos parasitos causadores destas doenças, através da inibição seletiva da enzima diidroorotato desidrogenase. Técnicas modernas de Química Medicinal foram aplicadas para a busca de ligantes seletivos das enzimas DHODHs de *T. cruzi* e *L. major*, cujos parasitos pertencem à família dos tripanossomatídeos. Além da descoberta de inibidores específicos para as enzimas dos tripanossomatídeos, este trabalho também tinha como objetivo promover a avaliação do modo de interação destes compostos, visando uma melhor compreensão do mecanismo catalítico das enzimas DHODHs da classe 1A, para, desta forma, auxiliar na proposição de moléculas bioativas mais potentes e seletivas. Devida a alta similaridade estrutural e funcional observada para as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, moléculas identificadas neste trabalho como ligantes poderão também ser testadas contra a enzima DHODHs de outras espécies de parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*.

Os objetivos específicos foram:

- Identificação e mapeamento dos potenciais sítios alvos para inibição das enzimas TcDHODH e LmDHODH;
 - Identificação de novos inibidores através da aplicação de técnicas *in silico* (docagem) e *in vitro*;
 - Avaliação do potencial inibitório de compostos identificados através da determinação dos valores de IC₅₀;
 - Avaliação cruzada com a enzima humana correspondente para a verificação da seletividade dos compostos identificados;
 - Mapeamento do mecanismo de inibição dos compostos identificados através da determinação da estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH em complexo com os ligantes identificados.
-

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PRODUÇÃO HETERÓLOGA DAS ENZIMAS DHODHS

3.1.1. LMDHODH

Para a realização dos ensaios de cinética enzimática e cristalização, a enzima LmdHODH foi expressa e purificada seguindo o protocolo implementado em nosso grupo de pesquisa (FELICIANO; CORDEIRO; NONATO, 2006). A expressão heteróloga da enzima foi realizada utilizando a cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli*, em meio de cultura LB na presença do antibiótico canamicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). A expressão da enzima foi induzida com IPTG a 0,5 mM por cinco horas a 25 °C. A construção utilizada, onde a proteína se encontra fusionada a um peptídeo contendo seis resíduos de histidina, permitiu que o processo de purificação fosse realizado em uma única etapa e que consiste em uma cromatografia de afinidade através da utilização da resina Ni-NTA Agarose (Qiagen). Esta etapa cromatográfica consistiu na utilização da afinidade da cauda de histidina fusionada à nossa enzima, com íons bivalentes, no caso o Níquel, ligados na matriz de agarose. A resina foi inicialmente equilibrada com tampão 50 mM NaH_2PO_4 em pH 8 e 300 mM NaCl. Para a remoção de contaminantes, a resina de níquel foi lavada com um gradiente crescente de imidazol (0 mM a 50 mM), e a eluição da enzima LmdHODH foi realizada na presença de 100 mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl e 100 mM imidazol). Para os ensaios de cristalização e atividade enzimática a enzima purificada foi concentrada em um concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore) e dialisada contra o tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl.

3.1.2. TcDHODH-Y

A enzima TcDHODH-Y foi expressa e purificada seguindo inicialmente o protocolo determinado em nosso grupo de pesquisa (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008). A expressão heteróloga da enzima foi realizada utilizando a cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli*, em meio de cultura LB na presença do antibiótico canamicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$). A expressão da enzima foi induzida com 1 mM de IPTG por cinco horas a 25 °C. A construção utilizada, onde a proteína se encontra fusionada a um peptídeo contendo seis resíduos de histidina, permitiu que o processo de purificação fosse realizado em uma única etapa e que consiste em uma cromatografia de afinidade através da utilização da resina Ni-NTA Agarose (Qiagen). Nesta

purificação, a resina foi inicialmente equilibrada com tampão 50 mM NaH_2PO_4 em pH 8 e 300 mM NaCl. Para a remoção de contaminantes, a resina de níquel foi lavada com um gradiente crescente de imidazol (0 mM a 50 mM), e a eluição da enzima LmDHODH foi realizada na presença de 100 mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl e 100 mM imidazol). Embora o processo de purificação por afinidade seja eficiente para obtenção da enzima pura, outras estratégias cromatográficas adicionais foram testadas com o objetivo de maximizar a homogeneidade da amostra, essencial para a realização dos ensaios de cristalização.

3.1.2.1. Cromatografia de interação hidrofóbica

Foram inicialmente testadas cromatografia de troca iônica e cromatografia por filtração em gel, sem sucesso. No entanto, a otimização do protocolo de purificação adicional utilizando a cromatografia por interação hidrofóbica, se mostrou eficiente para maximizar a homogeneidade da amostra.

A cromatografia de interação hidrofóbica foi realizada em um sistema de cromatografia líquida ÄKTA *prime*TM, utilizando duas colunas sequencialmente acopladas do tipo HiTrapTM Phenyl HP de 1 mL cada (GE Healthcare). A corrida foi realizada durante toda a purificação com um fluxo na coluna de 1,0 mL/min. Amostras provenientes da purificação de 500 mL de cultura por cromatografia por afinidade foram utilizadas nesta etapa. Antes de ser efetuada a injeção da amostra na coluna, esta foi pré-equilibrada com a passagem de 6 mL do tampão B (50 mM Tris ajustado em pH 7,5 e 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a 60 %. Após a injeção, a resina foi lavada com 10 mL do tampão B a 60% para a eliminação de qualquer material que não tenha interagido com a resina. Após a primeira etapa de lavagem, iniciou-se um gradiente decrescente linear de sal através da mistura com o tampão A (50 mM Tris ajustado em pH 7,5), onde a concentração do tampão A variou de 40 a 100% em 7,5 mL de solução. Para concluir o protocolo de purificação, a coluna foi lavada com 10 mL do tampão A para eliminar qualquer proteína que tenha interagido fortemente com a resina.

No protocolo inicialmente testado, foi possível identificar a presença de dois picos que eluem muito próximos. Desta forma, para uma melhor separação destas frações, optamos por explorar um diferente protocolo de eluição onde o

gradiente linear de remoção de sal foi substituído por um gradiente “step”. No protocolo otimizado, o fluxo na coluna foi mantido a 1 mL/min e a coluna foi equilibrada reduzindo a concentração do tampão B (50 mM Tris ajustado em pH 7,5 e 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) para 50 %. Após a injeção, a resina foi inicialmente lavada com 7,5 mL de tampão B a 50% para a eliminação de qualquer material que não tenha interagido com a resina. Após a primeira etapa de lavagem, a concentração do tampão B foi reduzida a 19,7 %, ou seja, 80,3 % do tampão A (50 mM Tris ajustado em pH 7,5) onde a condutividade da solução era de aproximadamente 46 mS/cm. Estas condições foram mantidas durante a passagem de 10 mL de solução, possibilitando a eluição do primeiro pico. Após a eluição do primeiro pico, a concentração do tampão A foi levada a 100 %, onde a condutividade era de aproximadamente 18 mS/cm, e o segundo pico foi eluído. A análise de ambas as frações eluídas, bem como a amostra que foi injetada na coluna, foi realizada através de SDS-PAGE – 12%. A revelação do gel foi efetuada com o corante “*Coomassie brilliant blue*”. As duas frações foram concentradas separadamente em um concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore) e dialisadas contra o tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl para os experimentos subsequentes.

3.1.2.2. Avaliação da atividade enzimática das frações I e II

As duas populações provenientes da cromatografia por interação hidrofóbica foram submetidas a medidas de atividade enzimática para avaliarmos as diferenças na atividade catalítica de cada uma delas. A medida da atividade foi realizada através de um ensaio espectrofotométrico que monitora a formação do produto da catálise, a molécula de orotato, a 300 nm e 25 °C (NORAGER et al., 2003; FELICIANO; CORDEIRO; NONATO, 2006). A reação foi iniciada pela adição de 10 μL da enzima a 27 μM (concentração final de 270 nM) a uma solução contendo 50 mM Tris, pH 8,15; 150 mM KCl na presença dos dois substratos: DHO (30 μM) e fumarato (1 mM) em um volume final de 1mL. A varredura foi realizada em cubetas de quartzo por 30 segundos em um Espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC gentilmente cedido pela Profa. Dra. Mônica Tallarico Pupo. O perfil das curvas obtidas foi comparado para determinarmos a diferença na atividade enzimática apresentada entre as duas populações.

3.1.3. TcDHODH-Y-SHis

A enzima TcDHODH-Y foi primeiramente clonada em nosso laboratório fusionada a uma cauda de histina, artefato este utilizado para possibilitar a purificação da mesma por uma única etapa cromatográfica, cromatografia de afinidade (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008). No entanto, os cristais de TcDHODH-Y obtidos na presença desta cauda possuíam parâmetros cristalinos que permitiam a formação de cristais geminados (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008). A geminação é um tipo de desordem cristalina que prejudica a qualidade dos dados cristalográficos e, conseqüentemente, a qualidade do modelo final. Uma vez que os cristais obtidos da enzima DHODH de *T. cruzi* cepa Tulahuen gene 2 (TcDHODH-T2), expressa sem a cauda de histidina, eram de boa qualidade, optamos por clonar a enzima TcDHODH-Y, foco de nosso trabalho, em uma nova construção, também na ausência da cauda de histidina, objetivando obter cristais de melhor qualidade (INAKA et al., 2008). Vale ressaltar, que inúmeras buscas de uma nova condição de cristalização, da proteína TcDHODH-Y fusionada com a cauda de histidina, foram realizadas sem sucesso, justificando a necessidade da clonagem da enzima de interesse em uma nova construção.

3.1.3.1. Clonagem da enzima TcDHODH-Y-SHis

A clonagem da enzima sem cauda de histidina, denominada TcDHODH-Y-SHis, foi realizada utilizando como DNA template a construção TcDHODH-Y em pET28a(+) com cauda, previamente clonada no vetor de expressão pET28a(+). Os oligonucleotídeos foram desenhados manualmente a partir da sequência do gene que codifica a proteína TcDHODH-Y, para a inserção de sítios de restrição para as enzimas *NcoI* e *NotI* (**Tabela 3**). A escolha dos sítios de restrição foi baseada na ausência dos mesmos no gene de interesse e na utilização de sítios de restrição comum ao vetor de expressão pET28a(+).

Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma que ambos, o direto e o reverso, possuíssem temperaturas de anelamento próximas para maximizar o sucesso da reação de amplificação do gene de interesse.

A temperatura de anelamento para cada oligonucleotídeo foi calculada através da fórmula:

$$Tm = 60 + 41(G+C)/L - 500/L$$

onde G e C são os números de nucleotídeos Guanina e Citosina e L é o número de nucleotídeos total, todos da sequência de TcDHODH-Y utilizada na construção do oligonucleotídeo. As temperaturas de anelamento obtidas foram de 55,9 °C para o oligonucleotídeo direto e 55,4 °C para o reverso.

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene de interesse para a clonagem. As sequências de iniciação e terminação de transcrição do gene de interesse estão em negrito. Os sítios de restrição estão sublinhados e correspondem as enzimas *NcoI* (direto) e *NotI* (reverso)

Oligonucleotídeo	Sequência
Direto	5'- GACGACCC <u>ATGGGC</u> CATGATGTGTCTGAAGCTCAACCTC - 3'
Reverso	5'- GACGACGCGGCCGCTT <u>CACT</u> CAATT - 3'

A ampliação do gene de interesse por PCR foi realizada utilizando: 0,5 µM de cada oligonucleotídeo, 3 ng/µL de DNA molde (TcDHODH-Y em pET28a(+)), 2,5 mM de MgSO₄ (Fermentas), 200 µM de dNTP mix (Invitrogen), tampão da Taq DNA Polymerase TrueStart 1X (Fermentas), 1,25 unidade de Taq DNA Polymerase TrueStart (Fermentas), em um volume final de 50 µL. A reação se iniciou com a desnaturação do DNA incubando-se a reação a 95 °C por 2 minutos, seguida por 25 ciclos de 95 °C por 1 minuto para desnaturação. Dando sequência, diferentes temperaturas de anelamento (50, 55, 60 °C) por 1 minuto foram testadas, seguida pela incubação da reação a 72 °C por 1 minuto para a etapa de extensão. O ensaio terminou através da incubação a 72 °C por 1 minuto para a terminação. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8 % (w/v) preparado com tampão TAE (EDTA 10 mM; Tris-acetato 40 mM pH 8,0) e contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo (Invitrogen). As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25 % (w/v), xileno cianol FF 0,25 % (w/v) e glicerol 30 % (v/v)). A corrida eletroforética foi processada em uma cuba contendo tampão TAE, sob uma tensão de 90 V, durante 1 hora e 30 min. Os géis foram visualizados sob

luz ultravioleta. O produto de PCR foi excisado do gel e purificado utilizando o kit de extração QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

O vetor de expressão pET28a(+) e o produto de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *NcoI* *FastDigest* (Fermentas) e *NotI* *FastDigest* (Fermentas). Após a digestão, o vetor e o produto de PCR apresentam extremidades coesivas, que permitem o anelamento do produto de PCR ao vetor. Como as enzimas *NcoI* e *NotI* utilizam o mesmo tampão, foram realizadas reações de dupla digestão, descritas na **Tabela 4**. As reações de digestão foram mantidas a 37 °C por 18 horas para o vetor pET28a(+) e o produto de PCR. As reações de digestão foram purificadas utilizando o kit de purificação QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). A digestão foi analisada em gel de agarose 0,8 % e a quantidade de DNA foi estimada comparando-se as intensidades das bandas obtidas com as do padrão de peso molecular 1kb DNA *ladder* (BioLabs).

Tabela 4: Reações de digestão do produto de PCR e vetor pET28a(+) com as enzimas de restrição *NcoI* e *NotI*

	Produto de PCR	pET28a(+)
<i>NcoI</i> <i>FastDigest</i> (1 U/μL)	1 μL	1 μL
<i>NotI</i> <i>FastDigest</i> (1 U/μL)	1 μL	1 μL
<i>FastDigest</i> Buffer (10X)	3 μL	2 μL
DNA	25 μL (~1,8 μg)	16 μL (~1,8 μg)
Volume total	30 μL	20 μL

As reações de ligação, do vetor de expressão ao produto de PCR digeridos, foram realizadas na presença da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em um banho a 16 °C por 22 horas e estão representadas na **Tabela 5**. Estas reações foram montadas variando-se as proporções de inserto e vetor, de modo a maximizar as chances de sucesso do experimento. A transformação das células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5α, com o plasmídeo recombinante TcDHODH-Y-SHis-pET28a, foi realizada por choque térmico. As bactérias foram retiradas do freezer a -80 °C e deixadas em repouso no gelo por 20 minutos para descongelar. Um volume de 100 μL de bactéria foi adicionado a 10 μL da reação de ligação, sem agitação. A

mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Após este tempo, as bactérias foram colocadas em gelo novamente por 2 minutos e adicionadas de 270 µL de meio de cultura LB. A suspensão de bactérias foi incubada a 200 rpm por 1 hora a 37 °C. As células foram semeadas em meio de cultura LB sólido (10 g bactotripton, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl, 17 g Agar e 950 mL H₂O, para 1 L de solução) contendo antibiótico (canamicina 30µg/mL) adequado para a seleção das bactérias transformadas. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C e as colônias que cresceram foram isoladas para analisar a presença do plasmídeo contendo nosso inserto de interesse.

Tabela 5: Reações de ligação do produto de PCR e vetor pET28a(+) digeridos com as enzimas de restrição *Nco*I e *Not*I

	Ligação 1	Ligação 2	Ligação 3	Ligação 4	Ligação 5
pET28a(+) (~40 ng/µL)	4 µL	4 µL	4 µL	2 µL	2 µL
Produto de PCR (~80 ng/µL)	4 µL	6 µL	8 µL	2 µL	4 µL
T4 DNA ligase (1U/µL)	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Tampão T4 (5X)	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
H ₂ O	7 µL	5 µL	3 µL	11 µL	9 µL
Volume total	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL	20 µL

Para analisar a presença do plasmídeo contendo o inserto de interesse, algumas colônias foram submetidas à técnica de PCR de colônia. As reações de PCR foram montadas contendo: tampão da Taq DNA Polymerase com KCl 1X (Fermentas), 0,2 mM de dNTP mix (Invitrogen), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo, 2 mM de MgCl₂ (Fermentas), 1 unidade de Taq DNA Polymerase (Fermentas), em um volume final de 10 µL. O ciclo da reação de PCR é o mesmo descrito anteriormente com temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos de 55 °C. Para checar a presença de clones positivos as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8 %. A colônia selecionada foi utilizada para preparar estoque em glicerol (8 %) e armazenada a -80 °C. Os plasmídeos recombinantes foram purificados com o kit de purificação Wizard *Plus* SV Minipreps (Promega), de acordo com as especificações

do fabricante, e quantificados espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm. A transformação das células de *E. coli* cepa BL21(DE3) com o plasmídeo recombinante TcDHODH-Y-SHis-pET28a foi realizada por choque térmico da mesma forma descrita anteriormente. As células transformadas foram armazenadas na forma de estoque em glicerol (8 %) e mantidas a -80 °C para os ensaios de expressão.

3.1.3.2. Teste de expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis

No sistema de expressão escolhido, o DNA de interesse foi clonado em um vetor de expressão contendo o *lacI* (repressor), *lacP* (promotor) e *lacZ* (gene estrutural transcrito para mRNA da beta-galactosidase). A indução da transcrição é obtida pela adição de um análogo de lactose sintético e não degradável (IPTG), o qual se associa ao repressor e inibe-o, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e consequente transcrição do gene de interesse. Testes de expressão foram realizados objetivando otimizar a concentração do agente indutor IPTG (isopropyl β -D-1-tiogalactopiranosídeo) e do tempo de expressão, de forma a maximizar o rendimento e a solubilidade da proteína de interesse.

A temperatura de expressão foi mantida fixa em 25 °C, seguindo a mesma temperatura dos experimentos realizados com a enzima na presença da cauda de histidina (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008). Os ensaios de expressão foram realizados utilizando *E. coli* cepa BL21(DE3), variando as concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1,0 mM) e o tempo de indução (5 e 20 horas). Foi utilizado como pré-inóculo meio de cultura LB contendo antibiótico apropriado, 30 μ g/mL de canamicina, inoculado com amostra de estoque em glicerol e incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 16 horas. O pré-inóculo foi diluído em 40 mL de meio LB, proporção 1:100, com antibiótico, 30 μ g/mL de canamicina, e incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Neste ponto, a cultura foi dividida em 4 volumes de 10 mL, sendo que um foi usado como controle (sem adição de IPTG) e os três restantes foram induzidos com diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1,0 mM). A cultura foi incubada a 25 °C sob agitação de 250 rpm e alíquotas de 2 mL foram retiradas nos intervalos de 5 e 20 horas. As amostras foram centrifugadas

a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, o precipitado contendo as células das bactérias foi armazenado no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

As células foram ressuspendidas em 300 µL de tampão 50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl, sonicadas 6 vezes de 5 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 10.000g por 15 minutos a 4 °C. Para verificar o rendimento e a solubilidade da proteína e, desta forma, determinar um protocolo com as melhores condições de expressão para a realização dos experimentos em alta escala, os precipitados e sobrenadantes obtidos foram separados e analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE – 12 %). A revelação do gel foi efetuada com o corante “Coomassie brilliant blue”.

3.1.3.3. Expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis

Os experimentos de expressão em larga escala para a construção TcDHODH-Y-SHis foram realizados na melhor condição obtida nos testes de expressão, que consiste na indução de expressão com 0,1 mM do agente indutor IPTG, por 5 horas a 25 °C. A expressão foi realizada utilizando como pré-inóculo 10 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, 30 µg/mL de canamicina, e mantido sob agitação de 250 rpm por 16 h a 37 °C. O pré-inóculo foi diluído em 1 L de meio LB, proporção 1:100, contendo antibiótico (30 µg/mL de canamicina) e incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm até atingir DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com 100 mM de IPTG e mantida sob agitação de 250 rpm por 5 h a 25 °C. Após as 5 horas de indução, a cultura foi dividida em vinte partes, 50 mL cada, e centrifugada em tubos de centrífuga de fundo cônico (tipo Falcon) numa rotação de 6.000 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram armazenadas no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

3.1.3.4. Purificação da enzima TcDHODH-Y-SHis

Todos os passos da purificação foram realizados à baixa temperatura (4 °C) para evitar a desnaturação da proteína. Para evitar desperdício e realizar os experimentos de cristalização com proteína fresca, em cada etapa de purificação foram ressuspendidas células provenientes de 50 mL de meio de cultura, gerando

um rendimento aproximado de 3 mg de proteína pura no final de todo o processo. As células foram inicialmente descongeladas e ressuspensas em um tampão apropriado denominado tampão de lise (pH 8, 10 mM Tris e 1 mM PMSF). O material ressuspensado foi sonificado dez vezes em pequenos intervalos de tempo (30 segundos). Após ter sido sonificada, a amostra foi centrifugada por uma hora a 10.000 g e 4 °C.

A escolha do tipo de cromatografia depende das características biológicas e físico-químicas da molécula da proteína: tamanho (cromatografia por exclusão molecular), carga elétrica (cromatografia de troca iônica), características de bioespecificidade (cromatografia por afinidade) e hidrofobicidade (cromatografia de interação hidrofóbica). Para o isolamento da proteína TcDHODH-Y-SHis, o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido a três etapas de purificação constituídas de uma cromatografia de troca aniônica, cromatografia de interação hidrofóbica e cromatografia por exclusão molecular, como detalhado a seguir.

(a) Cromatografia de Troca Aniônica

A cromatografia de troca aniônica foi realizada em um sistema de cromatografia líquida ÄKTA *prime*TM, utilizando uma coluna C10/10 contendo 10 mL da resina DEAE SepharoseTM-FF (Amersham Bioscience). A corrida foi realizada com um fluxo na coluna de 1,0 mL/min. Antes de ser efetuada a injeção do extrato bruto na coluna, esta foi pré-equilibrada com a passagem de 10 mL do tampão A (10 mM Tris ajustado em pH 8). Após a injeção, a resina foi lavada com 30 mL do tampão A, quando foi removido o material que não interagiu com a resina. Após a primeira etapa de lavagem, iniciou-se a etapa de eluição das proteínas que interagiram com a coluna, através da aplicação de um gradiente crescente linear do tampão B (10 mM Tris ajustado em pH 8 e 1 M NaCl). A concentração de sal foi variada de forma a obter a melhor separação da proteína de interesse das demais. A concentração 100% do tampão B foi atingida com a passagem de 60 mL de solução (1 mL/min) e mantida a 100% por cinco minutos de corrida, para eliminar qualquer proteína que tenha interagido fortemente com a resina. A identificação dos picos de absorbância, presente no cromatograma, assim como a avaliação do grau de pureza correspondente a enzima TcDHODH-Y-SHis foi realizada através de SDS-PAGE – 12%. A revelação do gel foi efetuada com o corante “*Coomassie brilliant blue*”. As

amostras contendo a enzima de interesse foram concentradas em um concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore). A proteína foi dialisada para a próxima etapa cromatográfica em tampão 50 mM Tris ajustado em pH 7,5 e 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

(b) Cromatografia de Interação Hidrofóbica

A cromatografia de interação hidrofóbica foi realizada em um sistema de cromatografia líquida ÄKTA *prime*TM, utilizando uma coluna HiTrapTM Phenyl HP de 1 mL (GE Healthcare). A corrida foi realizada durante toda a purificação com um fluxo na coluna de 1,0 mL/min. Antes de ser efetuada a injeção da amostra na coluna, proveniente da cromatografia de troca aniônica, esta foi pré-equilibrada com a passagem 3 mL do tampão A (50 mM Tris ajustado em pH 7,5 e 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Após a injeção, a resina foi lavada com 15 mL do tampão A, onde todo o material que não interagiu com a resina foi eliminado. Após a primeira etapa de lavagem, iniciou-se um gradiente decrescente de sal através da mistura com o tampão B (50 mM Tris ajustado em pH 7.5). A concentração do tampão B variou de 0 a 100 % em 25 mL de solução. Essa concentração foi mantida por mais 10 mL de corrida, para eliminar qualquer proteína que tenha interagido fortemente com a resina. A identificação do pico de absorbância, no cromatograma, correspondente a enzima TcDHODH-Y-SHis foi realizada através de SDS-PAGE – 12%. A revelação do gel foi efetuada com o corante “*Coomassie brilliant blue*”. As amostras contendo a enzima de interesse foram concentradas em um concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore). A proteína foi dialisada para a próxima etapa cromatográfica em tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl.

(c) Cromatografia por Filtração em Gel

A cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada com um fluxo na coluna de 1,0 mL/min, com um tampão de corrida apropriado (50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl) para manter a estabilidade da proteína. A cromatografia de filtração em gel foi realizada em um sistema de cromatografia líquida ÄKTA *prime*TM, utilizando uma coluna contendo 120 mL da resina SephacrylTM S-100 (Amersham Bioscience). Para a purificação de TcDHODH-Y-SHis, foi efetuada a injeção da amostra (1 ml), proveniente da cromatografia de interação hidrofóbica, em uma coluna pré-equilibrada com a passagem de dois

volumes de coluna do tampão A (50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl). Após a finalização da corrida e obtenção do cromatograma, as frações correspondentes ao centro do pico de absorbância, referente à enzima de interesse, foram combinadas e a proteína foi concentrada em um concentrador Ultrafree-30kDa (Millipore). A análise da pureza da enzima de interesse foi realizada através de SDS-PAGE – 12%. A revelação do gel foi efetuada com o corante “*Coomassie brilliant blue*”. A proteína purificada foi concentrada em um concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore) e dialisada contra o tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl para os experimentos subsequentes.

3.1.4. HsDHODH

Para a validação da seletividade dos inibidores encontrados para as enzimas DHODHs dos tripanossomatídeos, *T. cruzi* e *L. major*, foram também ensaios de cinética enzimática utilizando a enzima DHODH humana (HsDHODH) como controle. Deste modo, também foi necessária a expressão da enzima DHODH humana, cujo protocolo adotado está sendo descrito a seguir.

3.1.4.1. Clonagem da enzima HsDHODH

Através da colaboração com o grupo do Prof. Jon Clardy (Universidade de Harvard), coordenador da pesquisa com a enzima DHODH humana, nos foi disponibilizado a construção pET22b-HsDHODH que já continha o gene da enzima HsDHODH clonado no vetor de expressão pET22b(+). Nesta construção, a proteína de interesse deveria ser expressa fusionada a uma cauda de seis resíduos de histidina na região C-terminal. No entanto, como não conseguimos visualizar expressão nesta construção, utilizamos a construção pET22b-HsDHODH enviado pelo Prof. Dr. Jon Clardy como molde para subclonar a enzima em uma nova construção, no vetor de expressão pET28a(+) (Novagen). Desta forma, a nova construção por nós obtida e denominada HsDHODH-pET28a teria características similares a utilizada para os estudos estruturais realizado para a proteína humana (LIU et al., 2000). Nesta nossa nova construção, a enzima seria expressa fusionada à duas caudas de seis resíduos de histidina cada, uma na região N-terminal e outra na região C-terminal.

Para propagação do plasmídeo pET22b-HsDHODH e do vetor de expressão pET28a(+), amostras de estoque em glicerol de células de *Escherichia coli* cepa DH5 α contendo o plasmídeo HsDHODH-pET22b e contendo apenas o vetor pET28a(+) foram utilizadas para inocular 10 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado: 100 μ g/mL de ampicilina para a construção HsDHODH-pET22b e 30 μ g/mL de canamicina para pET28a(+). As culturas em questão foram mantidas a 37 °C sob agitação de 200 rpm por 16 horas, propiciando, desta forma, o crescimento das células de interesse, posteriormente centrifugada a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. O plasmídeo contendo o gene da enzima HsDHODH e o vetor pET28a(+) foram purificados através da utilização do kit de purificação Wizard *Plus* SV Minipreps (Promega), de acordo com as especificações do fabricante, e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm.

O vetor de expressão pET28a(+) e o vetor pET22b-HsDHODH foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I *FastDigest* (Fermentas) e *Xho*I *FastDigest* (Fermentas). Como as enzimas *Nde*I e *Xho*I utilizam o mesmo tampão, foram realizadas reações de dupla digestão, descritas na **Tabela 6**. As reações de digestão foram mantidas em banho a 37 °C por 18 horas. Para obtermos uma maior quantidade do fragmento correspondente ao gene que codifica HsDHODH, as reações de digestão do vetor pET22b-HsDHODH foram feitas em duplicata. O produto de digestão foi analisado em gel de agarose 0,8 % (m/v) preparado com tampão TAE (EDTA 10 mM; Tris-acetato 40 mM pH 8,0) e contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo (Invitrogen). As amostras foram preparadas adicionando-se tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25 % (m/v), xileno cianol FF 0,25 % (m/v) e glicerol 30 % (v/v)). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba contendo tampão TAE, sob uma tensão de 90 V, durante 1 hora e 30 min. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta. A banda referente ao gene da enzima HsDHODH foi excisada do gel e o gene purificado utilizando o kit de purificação QIAquick Gel Extraction (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante.

Tabela 6: Conteúdo das reações de digestão dos vetores pET22b-HsDHODH e pET28a(+) com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI*

	pET22b-HsDHODH	pET28a(+)
<i>XhoI</i> FastDigest (1 U/ μ L)	1 μ L	1 μ L
<i>NdeI</i> FastDigest (1 U/ μ L)	1 μ L	1 μ L
FastDigest Buffer (10X)	2 μ L	2 μ L
DNA	16 μ L (~1,5 μ g)	16 μ L (~1,5 μ g)
Volume total	20 μ L	20 μ L

As reações de ligação do gene da enzima HsDHODH ao vetor de expressão pET28a(+) foram realizadas na presença da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) em um banho a 16 °C por 22 horas e as condições reacionais estão resumidas na **Tabela 7**. Estas reações foram planejadas variando-se as proporções de inserto e vetor, de modo a maximizar as chances de sucesso do experimento.

Tabela 7: Conteúdo das reações de ligação do fragmento HsDHODH (proveniente do vetor pET22b-HsDHODH) e vetor pET28a(+) digeridos com as enzimas de restrição *XhoI* e *NdeI*

	Ligação 1	Ligação 2	Ligação 3	Ligação 4
pET28a(+) (~30 ng/ μ L)	3 μ L	4 μ L	1 μ L	2 μ L
Gene da enzima HsDHODH (~60 ng/ μ L)	5 μ L	6 μ L	6 μ L	3 μ L
T4 DNA ligase (1U/ μ L)	1 μ L	1 μ L	1 μ L	1 μ L
Tampão T4 (5X)	4 μ L	4 μ L	4 μ L	4 μ L
H ₂ O	7 μ L	5 μ L	8 μ L	10 μ L
Volume total	20 μ L	20 μ L	20 μ L	20 μ L

A transformação das células competentes de *Escherichia coli* cepa DH5 α , com o plasmídeo recombinante HsDHODH-pET28a, foi realizada por choque térmico. As bactérias foram retiradas do freezer a -80 °C e deixadas em repouso no gelo por 20 minutos para descongelar. Um volume de 100 μ L de bactéria foi adicionado a 10 μ L da reação de ligação, sem agitação. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Após este tempo, as bactérias foram colocadas em gelo novamente por 2 minutos e

adicionadas de 270 μ L de meio de cultura LB. A suspensão de bactérias foi incubada a 200 rpm por 1 hora a 37 °C.

As células transformadas foram semeadas em meio LB sólido (10 g bactotripton, 5 g extrato de levedura, 10 g NaCl, 17 g Agar e 950 mL H₂O, para 1 L de solução) contendo antibiótico (canamicina 30 μ g/mL) adequado para a seleção das bactérias transformadas. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C. Para analisar a presença do plasmídeo contendo nosso inserto de interesse, algumas colônias foram submetidas à técnica de PCR de colônia. As reações de PCR foram montadas contendo: tampão da Taq DNA Polymerase com KCl 1X (Fermentas), 0,2 mM de dNTP mix (Invitrogen), 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo (planejados para anelar nas regiões onde se encontra o sítio de restrição para *Bgl* II e na região que codifica a cauda de histidina na região C-terminal do pET28a), 2 mM de MgCl₂ (Fermentas), 1 unidade de Taq DNA Polymerase (Fermentas), em um volume final de 10 μ L. O ciclo de reação de PCR se iniciou com a desnaturação do DNA incubando-se a reação a 95 °C por 2 minutos, seguida por 25 ciclos de 95 °C por 1 minuto para desnaturação, 62,9 °C por 1 minuto para anelamento e incubação da reação à 72 °C por 1 minuto e meio para a etapa de extensão. O ensaio terminou com incubação a 72 °C por 10 minutos para a terminação. Para checar a presença de clones positivos as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8 %. A colônia selecionada foi utilizada para preparar estoque em glicerol (8 %) e armazenada a -80 °C. O plasmídeo recombinante foi purificado com o kit de purificação Wizard *Plus* SV Minipreps (Promega), de acordo com as especificações do fabricante, e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm.

A transformação das células de *E. coli* cepa BL21(DE3) com o plasmídeo recombinante HsDHODH-pET28a foi realizada por choque térmico. As bactérias foram retiradas do freezer a -80 °C e deixadas em repouso no gelo por 20 minutos para descongelar. Um volume de 100 μ L de bactéria foi adicionado a 10 μ L da reação de ligação, sem agitação. A mistura foi incubada no gelo por 30 minutos, seguida do choque térmico a 42 °C por 2 minutos. Após este tempo, as bactérias foram colocadas em gelo novamente por 2 minutos e adicionadas de 270 μ L de meio de cultura LB. A suspensão de bactérias foi incubada a 200 rpm por 1 hora a 37 °C. As células foram semeadas em meio de cultura LB sólido (10 g bactotripton, 5 g

extrato de levedura, 10 g NaCl, 17 g Agar e 950 mL H₂O, para 1 L de solução) contendo antibiótico (canamicina 30 µg/mL) adequado para a seleção das bactérias transformadas. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 16 horas a 37 °C e as colônias que cresceram foram armazenadas na forma de estoque em glicerol (8 %) e mantidas a -80 °C para os experimentos de expressão.

3.1.4.2. Teste de expressão da enzima HsDHODH

A temperatura de expressão foi mantida fixa em 25 °C. Todas as etapas de expressão foram realizadas em ambiente estéril. Os ensaios de expressão foram realizados utilizando *E. coli* cepa BL21(DE3), variando as concentrações de IPTG (5; 100 e 500 µM) e o tempo de indução (1; 3; 6 e 20 horas). Foi utilizado como pré-inóculo meio LB contendo antibiótico apropriado, 30 µg/mL de canamicina, inoculado com amostra de estoque em glicerol e incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm por 16 horas. O pré-inóculo foi diluído em 40 mL de meio LB, proporção 1:100, com antibiótico, 30 µg/mL de canamicina, e incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm até atingir uma DO₆₀₀ entre 0,5 e 0,6. Neste ponto, a cultura foi dividida em 4 volumes de 10 mL, sendo que um foi usado como controle (sem adição de IPTG) e os três restantes foram induzidos com diferentes concentrações de IPTG (5; 100 e 500 µM). A cultura foi incubada a 25 °C sob agitação de 250 rpm e alíquotas de 2 mL foram retiradas nos intervalos de 3, 6 e 20 horas. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C, o precipitado contendo as bactérias foi guardado no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

As células foram ressuspensas em 300 µL de tampão 50 mM NaH₂PO₄, pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,05% Triton X-100, sonicadas 6 vezes de 5 segundos, com intervalos de 30 segundos, e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 4 °C. Para verificar o rendimento e a solubilidade da proteína e, desta forma, determinar um protocolo com as melhores condições de expressão para a realização dos experimentos em alta escala, os precipitados e sobrenadantes obtidos foram separados e analisados por SDS-PAGE – 12. A revelação do gel foi efetuada através da utilização do corante “*Coomassie brilliant blue*”.

3.1.4.3. Expressão da enzima HsDHODH

Os experimentos de expressão em larga escala para a nova construção HsDHODH-pET28a foram realizados na melhor condição obtida nos testes de expressão, que consiste na indução de expressão com 500 μ M do agente indutor IPTG, por 6 horas à 25 °C. A expressão foi realizada utilizando como pré-inóculo 20 mL de meio LB contendo antibiótico apropriado, 30 μ g/mL de canamicina, e mantido sob agitação de 250 rpm por 16 h a 37 °C. O pré-inóculo foi diluído em 2L de meio LB, proporção 1:100, contendo antibiótico (30 μ g/mL de canamicina) e incubado a 37 °C sob agitação de 250 rpm até atingir DO_{600} entre 0,5-0,6. Neste momento, a expressão da proteína foi induzida com 500 μ M de IPTG e mantida sob agitação de 250 rpm por 6 h a 25 °C. Após as 6 horas de indução, a cultura foi centrifugada em tubos de centrífuga com fundo cônico (tipo Falcon) de 50 mL numa rotação de 6.000 g por 10 minutos a 4 °C. As células foram armazenadas no freezer (-20 °C) e o sobrenadante descartado.

3.1.4.4. Purificação da enzima HsDHODH

Todos os passos da purificação foram realizados à baixa temperatura (4 °C) para evitar a desnaturação da proteína. Células provenientes de 2 L de cultura foram inicialmente descongeladas e ressuspensas em 15 mL de um tampão apropriado denominado tampão de lise (pH 8, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 % Triton X-100 e 1 mM PMSF). O material ressuspendido foi sonificado 15 vezes em pequenos intervalos de tempo (30 segundos). Após esta etapa, a amostra foi deixada sob agitação branda em um agitador orbital por 30 minutos e, em seguida, centrifugada por trinta minutos a 10.000 g e 4 °C. Para o isolamento da proteína de interesse, HsDHODH, o sobrenadante, denominado extrato bruto, foi submetido a uma única etapa de purificação constituída de uma cromatografia por afinidade em coluna de Ni-NTA (Qiagen). O método cromatográfico utilizado para a purificação da enzima HsDHODH foi a cromatografia de afinidade. Neste processo, as proteínas foram separadas de acordo com a afinidade por um determinado ligante. Em nosso caso, HsDHODH foi expressa em fusão com duas caudas contendo seis aminoácidos de histidina cada que confere à enzima, em pH apropriado, afinidade por íons bivalentes carregados positivamente.

A resina utilizada nesta etapa possui como matriz (conjunto ligante–polímero) íons de níquel ligados a agarose, Ni-NTA (Qiagen).

Aproximadamente 1 mL de resina foi inicialmente equilibrada com o tampão de ligação (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM imidazol, 0,1 % Triton X-100 e 300 mM NaCl), o extrato bruto foi adicionado e o eluente coletado. Para a remoção de contaminantes que eventualmente interagiram com a resina, a mesma foi lavada com 50 vezes o volume de coluna com tampão contendo 10 mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100 e 10 mM imidazol), em seguida com 50 vezes o volume da coluna com tampão contendo 25 mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100 e 25 mM imidazol) e, por último, mais 50 vezes o volume de coluna com tampão contendo 50mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100 e 50 mM imidazol). A eluição da enzima HsDHODH foi efetuada na presença de 250 mM de imidazol (pH 8, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl e 250 mM imidazol) em 15 alíquotas de 2 mL. O grau de pureza da enzima HsDHODH foi monitorado via SDS-PAGE – 12 %. A revelação do gel foi efetuada com a utilização do corante “Coomassie brilliant blue”. As amostras contendo a enzima de interesse purificada foram concentradas e dialisada em um concentrador Ultrafree-10kDa (Millipore), contra o tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl, e armazenada para os experimentos subsequentes.

3.1.4.5. Dosagem da enzima HsDHODH

A estimativa da concentração da enzima HsDHODH não pode ser determinada pelo método do coeficiente de extinção molar, como foi feito para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH, isto porque, a presença do detergente Triton X-100 interfere significativamente na medida da absorbância, justamente por absorver fortemente a 280 nm. Desta forma, determinamos um método alternativo, através da estimativa da concentração de FMN na solução. Sabendo-se que cada domínio da DHODH possui uma molécula de FMN ligada, estimamos a concentração da proteína em função da concentração de FMN.

Para tanto, uma curva padrão, com diferentes concentrações de FMN (400 a 0 μM), preparadas por diluições seriadas, em função dos valores de absorbância determinados a 450 nm, foi traçada. A reta obtida segue a função:

$$\text{Abs} = a[\text{FMN}] + b$$

onde [FMN] é a concentração de FMN em μM (também correspondente a concentração da enzima HsDHODH em μM), Abs é a absorbância medida para a amostra de proteína, b é a interceptação da reta no eixo y e a é a inclinação da reta.

Desta forma, com os parâmetros da reta obtidos após a realização da curva padrão, e o valor da absorbância medida para a amostra de proteína, determinamos a concentração da enzima HsDHODH.

3.2. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE PARTIDA

3.2.1. VARREDURA *IN SILICO* EM BIBLIOTECA DE COMPOSTOS

Uma das estratégias adotadas para a identificação de moléculas bioativas, contra as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, envolveu uma técnica denominada varredura virtual de ligantes. Para a aplicação desta técnica foi preciso, primeiramente, identificar sítios que demonstravam exercer um papel importante para o alvo molecular. Em seguida, ligantes foram virtualmente docados nestes sítios, permitindo a identificação de moléculas bioativas. Após análise rigorosa das possíveis melhores moléculas identificadas virtualmente, a busca de empresas responsáveis pelo fornecimento de cada composto foi realizada no site Eolecules. Assim, os compostos selecionados foram adquiridos para os ensaios de inibição enzimática objetivando a comprovação da atividade inibitória *in vitro* de cada composto contra as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, bem como a caracterização estrutural do modo de interação dos inibidores com o alvo molecular. Vale ressaltar que nem todas as moléculas identificadas puderam ser adquiridas por falta de disponibilidade pelas empresas.

3.2.1.1. Identificação de sítios alvos nas DHODHs de tripanossomatídeos

A estrutura cristalográfica das enzimas DHODHs pertencentes à família dos tripanossomatídeos, TcDHODH-Y (PDB código: 3C3N) e LmDHODH (PDB código: 3GYE), foram resolvidas em nosso laboratório (CORDEIRO; FELICIANO; NONATO, 2006; PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008). A obtenção destas estruturas nos permitiu realizar uma análise estrutural bastante detalhada, identificando potenciais sítios que poderiam ser explorados para o planejamento de inibidores seletivos. A análise estrutural foi realizada comparando-se as estruturas das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH com as demais estruturas de enzimas DHODHs de ambas as classes, depositadas no banco de dados PDB (**Tabela 2**). A análise foi focada principalmente nas diferenças encontradas entre as enzimas de tripanossomatídeos e a enzima humana. As coordenadas das estruturas foram retiradas do banco de dados PDB. O alinhamento entre as sequências de aminoácidos das diferentes enzimas foi realizado utilizando o programa *MultAlin* (CORPET, 1988). Para uma melhor visualização do alinhamento utilizou-se o programa *ESPrpt* (GOUET et al., 1999). As sobreposições das estruturas para posterior análise foram realizadas no programa gráfico *Coot* (EMSLEY; COWTAN, 2004; EMSLEY et al., 2010). A análise das estruturas e a construção das ilustrações foram realizadas pelo programa gráfico *Pymol* (<http://www.pymol.org>). Além disso, informações prévias auxiliaram na identificação dos sítios alvos, como: importância da forma dimérica da classe 1A das DHODHs, avaliadas por experimento de mutagênese sítio-dirigida para as enzimas LIDHODH-A (BJORNBERG et al., 1997; OTTOSEN et al., 2002; NORAGER et al., 2003) e LmDHODH (manuscrito em preparação); possibilidade de identificação de compostos com atividade inibitória seletiva para enzimas DHODHs da classe 1A, demonstrados para a enzima LIDHODH-A (PALFEY; BJÖRNBERG; JENSEN, 2001); e a presença de diferenças estruturais significativas entre a enzima TcDHODH-Y e a enzima homóloga humana (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008). Após análises e comparações, através de buscas de regiões distintas tanto estruturalmente quanto sequencialmente, diferentes sítios foram identificados como promissores para a busca virtual de inibidores seletivos às enzimas DHODH de tripanossomatídeos. Os sítios identificados foram denominados S1 a S5, de acordo com a distância do sítio ativo (S1).

3.2.1.2. Varredura virtual de moléculas bioativas - Primeira Geração

A primeira tentativa de identificação de ligantes, por varredura virtual em biblioteca de compostos, foi realizada utilizando como alvo molecular a enzima TcDHODH-Y. Esta busca foi efetuada utilizando-se 3 diferentes estratégias.

3.2.1.2.1. Varredura virtual de ligantes – Estratégia I

A primeira estratégia de busca de moléculas bioativas para a enzima TcDHODH-Y foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari, coorientador deste trabalho e coordenador do grupo de Química Medicinal, localizado no departamento de Química e Física Molecular do Instituto de Química de São Carlos (Universidade de São Paulo). Nesta estratégia, foi realizada a busca de moléculas bioativas para os sítios S3-S4. Uma representação esquemática das etapas envolvidas nesta estratégia está demonstrada na **Figura 18**. O detalhamento de cada etapa está descrito a seguir.

Figura 18: Representação esquemática das etapas envolvidas na varredura virtual de ligantes utilizando a estratégia I. O processo envolve quatro etapas de filtragem. A primeira é realizada através da imposição de características físico-químicas desejadas, e as demais por docagem utilizando diferentes programas.

(a) Preparação da biblioteca de compostos

Além de uma alta afinidade pelo alvo molecular, a molécula bioativa necessita possuir propriedades farmacocinéticas (ADME/Tox - absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) apropriadas (BAURIN et al., 2004). Na contemporaneidade, tem-se focado muito no conceito de fármaco-similar dos compostos na preparação dos bancos de dados para os ensaios virtuais. Lipinski

define moléculas fármacos-similares como “aqueles compostos que apresentam propriedades ADME/Tox suficientemente aceitáveis para sobreviverem até o final dos testes clínicos da fase I” (MUEGGE, 2003). Os parâmetros comumente utilizados fazem parte da regra dos cinco de Lipinski (LIPINSKI, et al., 1997), que leva em consideração a importância da lipofilicidade (coeficiente de partição octanol-água), expressa por $\log P$, massa molecular (MM) e o número de doadores e receptores de ligações de hidrogênio. Este primeiro filtro fármaco-similar prevê que baixa absorção ou permeação é mais provável quando o composto apresenta mais de 5 doadores de ligações de hidrogênio, 10 receptores de ligações de hidrogênio, massa molecular maior que 500 Da e o coeficiente de partição ($\log P$) maior que 5.

Portanto, previamente aos ensaios virtuais de busca de ligantes foi preparada uma biblioteca de moléculas a serem testadas. As moléculas foram obtidas do banco de moléculas de domínio público não comercial ZINC versão 8 (<http://zinc.docking.org/index.shtml>). Dentro do banco de moléculas ZINC optamos por utilizar apenas moléculas comerciáveis, uma vez que as moléculas selecionadas pelo ensaio virtual seriam adquiridas para os ensaios *in vitro*. Todas as 8.720.873 coordenadas das moléculas foram adquiridas no formato mol2. Diante do vasto espaço químico da coleção virtual de moléculas, disponível no banco de dados ZINC, fez-se necessário selecionar apenas compostos com características potenciais de fármacos. Nesta etapa, utilizamos o programa FILTER da OpenEye Scientific Software (<http://www.eyesopen.com/products/applications/filter.html>) para filtrar o banco de moléculas inicial, eliminando compostos inapropriados ou indesejáveis. Este programa tem disponível um filtro padrão que envolve muito dos princípios de filtragem tradicionais, tais como remover substituintes tóxicos e reativos. Os critérios usados pelo FILTER para que uma dada molécula seja selecionada ou descartada dividem-se em três categorias: propriedades físicas, conteúdo atômico, grupos funcionais e propriedades topológicas. As propriedades físicas incluem: massa molecular, área superficial, $\log P$ e solubilidade em água. Os filtros também incluem o conteúdo relativo e absoluto de heteroátomos, assim como os limites do número de uma ampla variedade de grupos funcionais. As propriedades topológicas incluem: questões a respeito do número e tamanho dos anéis, flexibilidade da molécula, tamanho e a forma de cadeias alifáticas (LIPINSKI et al., 1997).

Foi selecionado o filtro fármaco-similar “drug-like” no programa FILTER para a realização da filtragem. Desta forma, somente moléculas que possuem algumas características necessárias para poderem atuar como fármacos foram selecionadas (OPREA et al., 2007). Os parâmetros utilizados por este filtro foram: massa molecular entre 100 e 600 Da, número de átomos pesados 10 a 35, número de anéis 0 a 5, número de átomos em anéis 0 a 20, número de átomos conectados em átomos não-cíclicos 0 a 15, número de grupos funcionais 0 a 18, átomos de carbono 3 a 35, átomos não ramificados 0 a 6, heretoátomos 2 a 20, percentagem de halogênios 0 a 0,5%, graus de liberdade da molécula 0 a 4, ligações rotacionais 0 a 20, ligações rígidas 0 a 35, número de doações de ligação de hidrogênio 0 a 6, número de receptores de ligação de hidrogênio 0 a 8, parâmetros que seguem a regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 1997) para ligação de hidrogênio, carga formal 0 a 3, somatória de carga formal -2 a 2, número de centro quirais 0 a 4, coeficiente de partição ($XlogP$) -5 a 6, compostos solúveis e altamente solúveis, número máximo de violação da regra de Lipinski igual a 1, filtros de eliminação de compostos que formam agregados (conhecidos e preditos), eliminação de metais como: Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Pd, Ag, Cd e grupos funcionais indesejados como quinonas, alquil fosfatos, corantes entre outros. Após a filtragem do banco de dados inicial, a sub-coleção foi submetida aos métodos de busca virtual de compostos bioativos, baseado na estrutura da enzima TcDHODH-Y.

(b) Docagem com o programa FlexX

O programa FlexX da Tripos (<http://www.tripos.com/>) trata o ligante como uma molécula flexível e o receptor como rígido. O programa divide o ligante ao longo de suas ligações simples em fragmentos, docando primeiramente um fragmento base no sítio alvo e, em seguida, conecta os outros fragmentos. Este programa utiliza um algoritmo baseado na construção incremental. Ao invés de identificar pontos no receptor onde o ligante pode se localizar, o programa FlexX define os chamados pontos de interação para cada possível grupo de interação do ligante e do receptor. Tendo designado os sítios de interação, um tipo de interação (receptor de ligação de hidrogênio, doador de ligação de hidrogênio, etc.) é modelada através de uma geometria de interação consistindo de um centro de interação e uma superfície esférica. Uma interação entre dois grupos A e B ocorre se: i) os tipos A e

B são compatíveis; ii) o centro de interação de A se posiciona sobre a superfície de interação de B, e vice versa. Desse modo, o programa FlexX distingue entre os seguintes tipos de interação: ponte salina, ligações de hidrogênio, complexos metálicos, interações específicas entre o centro de anéis aromáticos com alguns grupos e contatos hidrofóbicos não específicos.

A sub-coleção proveniente do banco de dados ZINC, selecionada através dos filtros de seleção, foi docada nos sítios S3-S4 e S5 da enzima TcDHODH-Y. Os ligantes foram ranqueados utilizando as funções de escore padrões do programa FlexX (D-Score; PMF_Score; G-Score; Chem_Score; Total_Score). Para fins comparativos, os valores obtidos por cada função de escore foram normalizados (ODA et al., 2006). Após a normalização dos valores de cada função de escore, foi realizada uma média das cinco funções, e as moléculas foram ranqueadas com base nessa média. As moléculas melhores ranqueadas, 5% primeiras do total, foram separadas para a próxima etapa do processo.

(c) Docagem com o programa *FRED*

O programa FRED (Fast Rigid Exhaustive Docking) da OpenEye Scientific Software (<http://www.eyesopen.com/>) considera o receptor e o ligante como moléculas rígidas. Para isto, o programa requer uma coleção multiconformacional dos ligantes como arquivo de entrada. Este programa utiliza um algoritmo baseado na busca exaustiva.

Os confôrmeros da cada molécula foram gerados utilizando o programa OMEGA da OpenEye Scientific Software (<http://www.eyesopen.com/products/applications/fred.html>). Esse programa é composto de dois componentes principais: modelo de construção e torção dirigida. Os componentes são independentes e podem ser usados dessa forma. O OMEGA constrói modelos iniciais das estruturas com base em padrões de ligações sigma. As conformações para cada fragmento molecular foram pré-gerados usando o programa MAKEFRAGLIB da OpenEye Scientific Software (<http://www.eyesopen.com/>). A construção das moléculas é acompanhada por um vetor simples de alinhamento, uma vez que todos os fragmentos são conectados ao longo das ligações σ . O programa OMEGA tenta gerar cada combinação possível de

conformações prováveis para uma dada estrutura. Os parâmetros utilizados para gerar a coleção multiconformacional foram os padrões do programa OMEGA.

O processo de docagem do programa FRED é constituído de duas etapas: ajuste da forma e otimização. Na primeira etapa, o ligante é colocado em uma caixa (área selecionada para o experimento de docagem) que engloba todos os átomos do sítio ativo utilizando um potencial Gaussiano. Em seguida uma série de três otimizações é processada: (1) refinamento da posição de átomos de hidrogênios de hidroxilas do ligante, (2) otimização do corpo rígido e (3) otimização da pose do ligante com relação ao ângulo diedro no espaço.

A sub-coleção proveniente do banco de dados ZINC, selecionada através dos filtros de seleção, foi docada nos sítios S3-S4 e S5 da enzima TcDHODH-Y. Os ligantes foram ranqueados utilizando as funções de pontuação padrões do programa FRED (ChemGauss3; ChemScore; OeChemScore; PLP; ShapeGauss). Para fins comparativos, os valores obtidos por cada função de escore foram normalizados (ODA et al., 2006). Após a normalização dos valores de cada função de escore, foi realizada uma média das cinco funções, e as moléculas foram ranqueadas com base nessa média. As moléculas melhores ranqueadas, 5% primeiras do total, foram separadas para a próxima etapa do processo.

(d) Consenso entre os resultados obtidos nos programas FlexX e FRED

Para dar continuidade a busca de ligantes, foram primeiramente identificadas as moléculas que foram bem ranqueadas nos dois programas FRED e FlexX, e estas utilizadas em uma nova etapa de docagem.

(e) Docagem com o programa GLIDE

As moléculas selecionadas por consenso entre os resultados de docagem dos programas FlexX e FRED, foram submetidas a experimentos de docagem no programa GLIDE (<http://www.schrodinger.com/>) (FRIESNER et al., 2004). Este programa utiliza um método de busca sistemática para a docagem de ligantes flexíveis. Em um primeiro momento, as propriedades do sítio a ser docado são mapeadas através de uma grade de potencial. Em seguida, um conjunto de conformações de baixa energia do ligante é docado no sítio. As poses obtidas são minimizadas dentro do sítio de interação e as seis de mais baixa energia são

selecionadas para uma simulação usando o método de Monte Carlo. Um conjunto inicial de conformações do ligante é selecionado a partir de uma enumeração exaustiva dos mínimos de energia no espaço de ângulos torsionais do ligante. Dada estas conformações, são executadas triagens iniciais sobre todo o espaço de busca disponível (translacional, orientacional e conformacional), para localizar configurações do ligante que sejam promissoras e posteriormente otimizá-las. Finalmente, de três a seis configurações de menor energia são submetidas a um procedimento de otimização. As moléculas foram ranqueadas pelo programa GLIDE e, através da análise visual juntamente com a pontuação dada a cada molécula pelo programa, foram selecionadas moléculas para serem adquiridas e, conseqüentemente, submetidas aos ensaios de atividade enzimática *in vitro*.

3.2.1.2.2. Varredura virtual de ligantes – Estratégia II

A segunda estratégia de busca de moléculas bioativas para a enzima TcDHODH-Y foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Brian Shoichet, da Universidade da Califórnia, São Francisco, com a ajuda de sua aluna de doutorado Rafaela Ferreira, que esteve em nosso laboratório. Nesta estratégia, foi realizada a busca de moléculas bioativas para os sítios S1 e S3-S4. Uma representação esquemática das etapas envolvidas nesta estratégia está demonstrada na **Figura 19**.

Figura 19: Representação esquemática das etapas envolvidas na varredura virtual de ligantes utilizando a estratégia II. O processo envolve apenas uma etapa de filtragem, efetuada por docagem.

A docagem foi realizada utilizando apenas o programa DOCK 3.5 (KUNTZ et al., 1982), cujo método é baseado na minimização do campo de força AMBER descrito pela mecânica molecular como energias de interação, que leva em conta

componentes eletrostáticos e de van der Waals. Neste programa, tanto o ligante quanto o receptor são considerados moléculas rígidas. Foram utilizados dois diferentes bancos de dados, também retirados do banco de moléculas de domínio público não comercial ZINC versão 8 (<http://zinc.docking.org/index.shtml>). Para o sítio S3-S4 foi utilizado o banco de dados “lead-like” (TEAGUE et al., 1999) (2.710.002 moléculas), consistindo de moléculas com massa molecular menor que 350 g/mol e xlogP menor que 3,5, e para o sítio S1 foi utilizado o banco de dados “fragment-like” (CARR et al., 2005) (435.539 moléculas), consistindo de moléculas com massa molecular menor ou igual a 250 g/mol e xlogP menor ou igual a 2,5. As moléculas foram ranqueadas de acordo com a energia de interação receptor-ligante estimada e, através da análise visual juntamente com a pontuação dada a cada molécula pelo programa, foram selecionadas as moléculas para serem adquiridas e, consequentemente, submetidas aos ensaios de atividade enzimática *in vitro*.

3.2.1.2.3. Varredura virtual de ligantes – Estratégia III

Esta estratégia foi desenvolvida pelo aluno Josmar Rodrigues da Rocha, do laboratório NEQUIMED-PN, localizado no Instituto de Química de São Carlos - USP, como parte de seu projeto de doutorado. Diferentemente das outras estratégias, esta varredura foi realizada utilizando-se uma biblioteca de compostos com moléculas análogas ao produto da catálise, orotato. Esta docagem foi realizada apenas focando o sítio S1 (sítio catalítico), utilizando o programa AutoDock 4.0 (CHELESKI et al., 2010).

3.2.1.3. Varredura virtual de moléculas bioativas - Segunda Geração

A resolução da estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH complexada com inibidores, identificados na primeira geração da busca virtual de ligantes, nos permitiu obter informações estruturais importantes que nos guiaram em novas buscas de inibidores mais seletivos contra as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos. Os novos ensaios de varredura *in silico* foram efetuados durante a realização do estágio em caráter doutorado sanduiche na University of Dundee (College of Life Science, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery), na Escócia, sob a supervisão da Profa. Ruth Brenk. A Profa Ruth Brenk

tem vasta experiência em técnicas de docking e lida fundamentalmente com todos os aspectos da química computacional, em particular a seleção e desenhos de ligantes baseado em estrutura de alvos moleculares de grande importância biológica.

Considerando a alta identidade sequencial compartilhada entre as enzimas de tripanosomatídeos, além da alta reprodutibilidade e qualidade dos cristais obtidos para a LmDHODH, optamos por utilizar a partir deste momento a enzima LmDHODH como alvo para os nossos experimentos de docagem. Esta nova varredura foi realizada explorando apenas o S1, utilizando a estrutura da enzima LmDHODH complexada com o inibidor ácido 5-nitroorótico (PDB código 3MHU) (CHELESKI et al., 2010), análogo ao orotato, como receptor para os experimentos de docagem. Uma representação esquemática das etapas envolvidas na varredura virtual da segunda geração de ligantes está demonstrada na **Figura 20**.

Figura 20: Representação esquemática das etapas envolvidas na varredura virtual da segunda geração de ligantes. O processo envolve três etapas de filtragem: Na primeira são selecionados compostos com características físico-químicas desejadas; na segunda são selecionados compostos com grupamentos capazes de manter as interações desejadas; na terceira através de experimentos de docagem.

(a) Preparação da biblioteca de compostos

Previamente aos ensaios virtuais de busca de ligantes foi preparada uma biblioteca de moléculas a serem testadas. As moléculas foram obtidas de um banco de moléculas comerciáveis, construído pela Profa. Ruth Brenk. Diante do vasto espaço químico da coleção inicial de moléculas, disponível neste banco de dados, fez-se necessário a realização de uma pré-filtragem. Os parâmetros utilizados por este filtro foram: massa molecular menor que 300 Da, número de anéis 1 a 2, número de doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 3, número de receptores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 6 e AlogP entre 1 e 3. Com base na estrutura cristalográfica do complexo LmDHODH com o inibidor ácido 5-nitroorótico, análogo ao orotato (PDB código 3MHU), foi possível identificar as importantes interações do ligante com o sítio ativo da enzima. Desta forma, o critério adotado para a nova etapa de docagem foi a de usar um filtro, baseado em um farmacóforo, onde as moléculas selecionadas deveriam possuir pelo menos duas das interações que se mostravam importantes para a interação de ligantes no sítio ativo, como demonstradas na **Figura 21**. Interessantemente, as três principais interações envolvem resíduos de asparagina, que podem atuar como doador/aceptor de ligações de hidrogênio.

Figura 21: Representação do sítio ativo da enzima LmDHODH em complexo com inibidor da primeira geração, ácido 5-nitroorótico. Conforme demonstrado, o sítio ativo possui duas regiões doadoras de hidrogênio (esferas em azul) e uma região aceptora de hidrogênio (esfera em vermelho), que são responsáveis pela interação com as duas regiões aceptoras de hidrogênio e uma região doadora de hidrogênio, conservadas nos ligantes encontrados no sítio ativo.

(b) Preparação do receptor no programa PLOP

Devido à alta flexibilidade da alça catalítica, os resíduos localizados nesta região (Ser130 a Gln139) não puderam ser visualizados nas estruturas cristalográficas dos complexos LmDHODH com inibidores da primeira geração (PDB

códigos 3MHU e 3MJY). A alça catalítica atua como uma tampa permitindo a entrada e saída dos ligantes ao sítio ativo, sendo assim, sua posição é fundamental para os experimentos de docagem no sítio ativo. Portanto, previamente aos experimentos de docagem, optamos por construir a alça catalítica através da utilização do programa PLOP (Protein Local Optimization Program) (JACOBSON et al., 2004). A idéia principal desta construção era a de modelar a estrutura do receptor (LmDHODH) com todos os resíduos que fazem parte do canal que dá acesso ao sítio ativo, permitindo, desta forma, otimizar e maximizar as interações dos ligantes no sítio de docagem. No programa PLOP inserimos as coordenadas da enzima e a sequência de aminoácidos da alça a ser construída, obtendo desta forma, algumas diferentes conformações da alça catalítica, posições essas ranqueadas pela menor energia.

(c) Docagem com o programa DOCK 3.5

Foi realizada a busca de moléculas bioativas para o sítio S1, utilizando o programa DOCK 3.5 (KUNTZ et al., 1982). As moléculas foram ranqueadas de acordo com a energia de interação receptor-ligante estimada. Através da análise visual juntamente com a pontuação dada a cada molécula pelo programa, foram selecionadas as moléculas para serem adquiridas e, conseqüentemente, submetidas aos ensaios de atividade enzimática *in vitro*.

3.2.2. VARREDURA EM BIBLIOTECA DE COMPOSTOS POR TERMOFLUOR

Além da busca virtual, também foi realizada uma busca de moléculas bioativas em biblioteca de compostos durante a realização do estágio em caráter doutorado sanduiche na University of Dundee (College of Life Science, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery), na Escócia, sob a supervisão do Prof. Willian N. Hunter.

Termofluor é o nome dado a um sistema automatizado usado para medir a temperatura de desnaturação (T_m) de proteínas de uma forma rápida, utilizando pequena quantidade de amostra. A medida é realizada através do uso de um corante específico que quando exposto a um ambiente hidrofóbico fluoresce. Assim, com um aumento de temperatura é observado um aumento no sinal de fluorescência, devido à interação do corante com os sítios hidrofóbicos da proteína

que passam a ficar expostos com o desenovelamento da mesma. Como resultado, uma curva do tipo sigmóide é obtida, cujo ponto de inflexão corresponde a T_m da proteína. Este método pode ser aplicado para diversas finalidades, mas foi originalmente desenvolvido para a varredura de moléculas bioativas, permitindo rápida identificação de ligantes para alvos moleculares em biblioteca de compostos (PANTOLIANO et al., 2001; LO et al., 2004; NIESEN; BERGLUND; VEDADI, 2007). A temperatura de desnaturação de uma determinada proteína na presença e ausência de um ligante teste pode ser determinada utilizando esta técnica. Moléculas que se ligam à proteína, estabilizando-a, provavelmente ocasionam um aumento na T_m e, conseqüentemente, ligantes mais potentes simplesmente geram maiores variações na temperatura de desnaturação da proteína (ΔT_m) (MATULIS et al., 2005). Outra aplicação atraente desta técnica é que ela pode elucidar funções a novos alvos moleculares com funções biológicas desconhecidas, através da identificação de ligantes para estes alvos (CUMMINGS; FARNUM; NELEN, 2006). Do ponto de vista cristalográfico, Termofluor pode ser um excelente método para varrer condições que estabilizam uma proteína em particular, previamente aos ensaios de cristalização. Utilizando tanto tampões ou ligantes que estabilizam uma determinada proteína, identificados por esta técnica, nos experimentos de cristalização, a probabilidade do crescimento de cristais desta proteína pode ser aumentada (ERICSSON et al., 2006). Neste projeto, esta técnica foi utilizada para a identificação de ligantes das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH, que consistiu na determinação da temperatura de desnaturação das ambas as enzimas na presença e ausência de ligantes, de forma a identificar qual molécula promovia aumento na estabilidade estrutural da proteína, através do aumento do T_m , consequência da estabilização da proteína devido a interação com o ligante. Os experimentos foram realizados em um termociclador em tempo real (Mx3005P™ Real-Time PCR system) equipado com filtros específicos para medir sinais de fluorescência, na presença do corante fluorescente SYPRO® orange (Invitrogen), que apresenta alta fluorescência em ambiente não polar, como por exemplo em sítios hidrofóbicos de proteínas desenoveladas. O experimento foi montado em uma placa de PCR contendo 96 poços. Em cada poço foi adicionado 40 μ L de uma solução de enzima a 10 μ M em tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl, acrescida de 0,1 % SYPRO® orange 5000 vezes concentrado em DMSO (Invitrogen). Em cada poço foi

adicionado 1 μ L de cada molécula da biblioteca a 40 mM (concentração final em solução de 1 μ M). A variação na intensidade de fluorescência foi monitorada utilizando os filtros FAM (492 nm) e ROX (610 nm), para excitação e emissão, respectivamente. A temperatura foi varrida de 25 a 95 °C (1 °C/min) e as medidas de fluorescência realizadas. A intensidade de fluorescência foi plotada em função da temperatura, gerando uma curva sigmoidal que pode ser descrita por dois estados de transição (mínima e máxima intensidade de fluorescência, proteína enovelada e desnaturada, respectivamente). Sendo que, o ponto de inflexão da curva de transição correspondia à temperatura de desnaturação da proteína (T_m).

Foram testados 1012 compostos provenientes de uma biblioteca de fragmentos da empresa Maybridge (<http://www.maybridge.com/>). A afinidade de interação do ligante foi estimada através da variação na temperatura de desnaturação da proteína (ΔT_m) na presença dos compostos testados.

3.2.3. VARREDURA EM BIBLIOTECA DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA

Na busca por inibidores das enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, foi estabelecida uma colaboração com o Prof. Dr. Flávio da Silva Emery da FCFRP - USP. Assim, uma série de moléculas sintetizadas pelo seu grupo de pesquisa, cuja atividade anti-leishmania já tinha sido avaliada em experimentos em cultura de *Leishmania* (manuscrito em preparação), sem que seu alvo ou alvos macromoleculares tenham sido identificados, nos foi cedida para a realização de ensaios de inibição enzimática, bem como caracterização estrutural. Desta forma, pudemos avaliar se esses compostos atuam em nosso alvo molecular (DHODH).

3.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO

Previamente ao planejamento dos ensaios de inibição enzimática por espectrofotometria, verificamos que a grande maioria dos compostos selecionados absorvia fortemente próximo ao comprimento de onda (300 nm) utilizado no ensaio de atividade enzimática, onde é monitorada a formação do produto da catálise, a molécula de orotato (NORAGER et al., 2003; FELICIANO; CORDEIRO; NONATO, 2006). Desta forma, utilizamos um segundo protocolo, otimizado em nosso laboratório, onde a atividade enzimática foi medida indiretamente através do

monitoramento da redução do reagente colorimétrico DCIP (2,6 - dicloroindofenol) de coloração azul, que deixa de absorver em 610 nm ($\epsilon=25,00 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) quando reduzido a DCIPH₂, tornando-se incolor (**Figura 22**). A redução do reagente DCIP é estequiometricamente equivalente a oxidação de DHO (MILLER, 1978), possibilitando o cálculo do consumo de substrato e/ou formação de produto em função do tempo e, consequentemente, a velocidade de reação.

Figura 22: Representação das estruturas químicas do agente colorimétrico 2,6 - dicloroindofenol oxidado (DCIP) e reduzido (DCIPH₂).

3.3.1. DHODHS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Para as enzimas DHODHs dos tripanossomatídeos, pertencentes à classe 1A, o segundo substrato da catálise, fumarato, foi substituído pelo DCIP, que também é capaz de atuar como agente oxidante das enzimas DHODHs da classe 1A, mesmo que com uma menor afinidade (ARAKAKI et al., 2008). No mecanismo catalítico dos ensaios realizados (**Figura 23**), a reação iniciou com a formação do complexo enzima-substrato (ES₁), onde S₁ correspondia à molécula de DHO. O produto da reação orotato (P₁) foi liberado deixando a enzima na forma modificada pela redução da coenzima a FMNH₂ (E'). Na segunda parte da reação, o agente oxidante, no caso o DCIP (S₂), ligou-se à enzima modificada (E'S₂) para a formação do segundo produto catalisado pela reação, DCIPH₂ (P₂), regenerando a enzima (E) para novos ciclos catalíticos.

Figura 23: Representação do mecanismo geral da reação catalítica promovida pelas enzimas DHODHs.

O experimento de inibição enzimática para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH foi realizado em um leitor de Elisa Tecan Sunrise™ gentilmente cedido pela Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga, do Laboratório de Toxinas Animais da FCFRP - USP. Os parâmetros utilizados no ensaio enzimático foram conforme dados a seguir: 200 µL de uma solução tampão (50 mM Tris, pH 8,15; 150 mM KCl; 0,01 % Triton X-100) na presença de 50 µM DHO e 100 µM DCIP foi adicionada em poços de uma placa de Elisa. As leituras foram realizadas em temperatura ambiente, 25 °C. As reações foram iniciadas pela adição de 5 µL da enzima a 26 µM (concentração final igual a 0,65 µM). A varredura foi realizada por 60 segundos. A curva controle, referência, foi obtida com a adição de 5 µL da enzima pura, na ausência de inibidores. A solução de proteína foi preparada através da mistura de 100 µL de proteína a 29 µM em 50 mM Tris, pH 8,15, 150 mM KCl com 10 µL de DMSO. Em seguida, para a obtenção das curvas na presença dos inibidores, a reação foi iniciada pela adição de 5 µL da enzima, incubada por 24 horas com 454 µM do inibidor a ser testado. A solução proteína mais inibidor foi preparada através da mistura de 100 µL de proteína a 29 µM com 10 µL do inibidor a 5mM (solubilizado em 100% de DMSO). Desta forma, a concentração final do inibidor na reação foi de 11µM e a de proteína foi de 0,65 µM.

As medidas foram realizadas em quadruplicata para cada composto. Baseado no coeficiente de extinção estimado para a molécula de DCIP ($\epsilon_{610nm}=25,00 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi possível calcular a quantidade de DCIP reduzido e, conseqüentemente, a quantidade de produto formado em função do tempo, utilizando a fórmula:

$$[\text{oro}]_f = A/(\epsilon b)$$

onde $[\text{oro}]_f$ corresponde a concentração de orotato formado, A corresponde a absorbância medida, ϵ corresponde ao coeficiente de extinção molar do DCIP no comprimento de onda monitorado ($\epsilon_{610nm}=25,00 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e b o caminho ótico.

Foram calculadas, desta forma, as médias das velocidades de reação na ausência e na presença de cada composto. A média da velocidade obtida na ausência de composto, denominada V_r , foi utilizada como controle, correspondendo

a velocidade com 100% da atividade enzimática. Já as médias das velocidades obtidas na presença dos inibidores foram denominadas de V_i .

A porcentagem de inibição (% Inibição) foi determinada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - (100V_i/V_r)$$

onde V_r é a velocidade de reação determinada na ausência de inibidor, curva referência, e V_i é a velocidade de reação na presença do inibidor.

As moléculas que interferiram na velocidade de reação das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH, inibindo-as, foram submetidas a novos ensaios de inibição para a determinação dos valores de IC_{50} , concentração de inibidor que diminui em 50% a atividade enzimática. Para a determinação do IC_{50} os ensaios de inibição foram repetidos onde foram variadas as concentrações dos inibidores testados. Assim, a solução proteína mais inibidor foi preparada através da mistura de 100 μ L de proteína a 29 μ M com 10 μ L do inibidor em diferentes concentrações, que foram preparadas por diluição seriada, dividindo por dois a cada diluição, iniciando a 200 mM e terminando a 12 μ M, amostra inicial diluída 14 vezes. A concentração final na reação de proteína foi de 0,65 μ M e do inibidor foi de 443 μ M a 26 nM. As porcentagens de inibição em cada concentração de um mesmo inibidor foram determinadas utilizando a mesma equação descrita anteriormente. Um gráfico de logaritmo da concentração do inibidor versus porcentagem de inibição foi traçado. Uma curva do tipo sigmóide foi obtida e pode ser descrita por dois estados de transição (mínima e máxima porcentagem de inibição, 0% e 100% de inibição, respectivamente), sendo seu ponto de inflexão correspondente ao log da concentração de inibidor responsável por 50% da perda de atividade enzimática(IC_{50}).

3.3.2. DHODH HUMANA - VALIDAÇÃO CRUZADA

Para a enzima DHODH humana, pertencente à classe 2, o DCIP não é capaz de atuar como agente oxidante, e portanto não é capaz de regenerar a

coenzima FMN para permitir novos ciclos de catálise, como observado em nossos experimentos da classe 1A das DHODHs. Assim, no ensaio enzimático utilizado para monitorar a ação inibitória dos compostos contra a enzima humana (**Figura 24**), a reação se iniciou com a formação do complexo enzima-substrato (ES_1), onde S_1 correspondia à molécula de DHO. O produto da reação orotato (P_1) foi liberado deixando a enzima na forma modificada pela redução da coenzima a $FMNH_2$ (E'). Na segunda parte da reação, o agente oxidante, no caso coenzima Q_0 (S_2), ligou-se à enzima modificada ($E'S_2$) para a formação do segundo produto catalisado pela reação, coenzima Q_0 reduzida (P_2), regenerando a enzima (E) para novos ciclos catalíticos. Neste ensaio, a redução do DCIP em $DCIPH_2$, que é utilizado para reoxidar a quinona reduzida (P_2), foi monitorado a 610 nm e equivale estequiometricamente a oxidação de DHO.

Figura 24: Representação do mecanismo geral da reação catalítica promovida pelas enzimas DHODHs.

O experimento de inibição enzimática para a enzima HsDHODH foi realizado em um leitor de Elisa Tecan SunriseTM gentilmente cedido pela Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga, do Laboratório de Toxinas Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Os parâmetros utilizados no ensaio enzimático foram otimizados conforme dados a seguir: 200 μ L de uma solução tampão (50 mM Tris, pH 8,15; 150 mM KCl; 0,01 % Triton X-100) na presença de 500 μ M DHO, 100 μ M coenzima Q_0 e 100 μ M DCIP foi adicionada em poços de uma placa de Elisa. As leituras foram realizadas em temperatura ambiente, 25 °C. As reações foram iniciadas pela adição de 5 μ L da enzima a 4 μ M (concentração final igual a 0,1 μ M). A varredura foi realizada por 60 segundos. A curva controle, referência, foi obtida com a adição de 5 μ L da enzima pura, na ausência de inibidores. A solução de proteína foi preparada através da mistura de 100 μ L de proteína a 4,4 μ M em 50 mM Tris, pH 8,15, 150 mM KCl com 10 μ L de DMSO. Em seguida, para a obtenção das curvas na presença dos inibidores, a

reação foi iniciada pela adição de 5 μL da enzima, incubada por 24 horas com 454 μM do inibidor a ser testado. A solução proteína mais inibidor foi preparada através da mistura de 100 μL de proteína a 4,4 μM com 10 μL do inibidor a 5 mM (solubilizado em 100% de DMSO). Desta forma, a concentração final do inibidor na reação foi de 11 μM e a de proteína foi de 0,1 μM . A porcentagem de inibição promovida por cada composto foi determinada da mesma forma como descrita anteriormente.

3.4. ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS DHODHS POR CRISTALOGRAFIA

3.4.1. CRISTALIZAÇÃO, COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS, RESOLUÇÃO DA ESTRUTURA E REFINAMENTO

Para a formação de um cristal, a solução de proteína deve ser levada para um estado de supersaturação; estado termodinamicamente instável, onde as moléculas de proteína são agrupadas de forma organizada. Diversos fatores podem ser combinados de forma a levar a solução de proteína para o estado de supersaturação e, conseqüentemente, formação do cristal. Os mais comumente utilizados são: temperatura, concentração do agente precipitante, pH, concentração de proteína, adição de ligantes que modificam a solubilidade da proteína, aumento e diminuição da concentração salina, dentre inúmeros outros.

Existem várias técnicas utilizadas para a cristalização de proteínas como diálise, difusão líquido-líquido e difusão de vapor. Dois dos métodos mais comuns para cristalização utilizam a técnica por difusão de vapor. Estes são conhecidos como o método da gota suspensa e gota sentada (MCPHERSON, 1982). Em ambos, uma gota contendo a solução de cristalização (tampão, precipitantes e aditivos, também chamada de líquido-mãe) é misturada a solução de proteína e equilibrada contra um reservatório contendo a mesma solução de cristalização. Desta forma, a solução de cristalização encontrada na gota se encontra inicialmente mais diluída que a encontrada no poço, e a diferença de concentração inicial entre gota e poço depende da razão de diluição inicial da gota. Este sistema é selado e o equilíbrio é alcançado por meio da difusão das espécies voláteis (água e solventes orgânicos) até que a pressão de vapor na gota se iguale àquela do reservatório (poço). A concentração dos precipitantes na gota aumenta, diminuindo assim a

solubilidade da solução de proteína e permitindo, em condições específicas, a formação de cristais.

Os métodos de gota suspensa e sentada diferem somente na posição em que a gota é colocada no experimento em relação à solução do poço. A **Figura 25** mostra uma representação esquemática de ambos os experimentos.

Figura 25: Representação dos dois métodos de cristalização por difusão de vapor: **(a)** em gota suspensa e **(b)** em gota sentada.

(a) Obtenção de complexos enzima-inibidor

De forma geral a incorporação dos inibidores nos cristais das enzimas foram realizados através de técnicas de co-cristalização e "soaking". Na técnica de co-cristalização, a enzima foi incubada com o inibidor previamente aos ensaios de cristalização e, a enzima complexada, submetida aos experimentos de cristalização sob as condições de cristalização originais obtidas para a enzima nativa. Nos experimentos de "soaking" os cristais de proteína nativa, depois de formados, foram incubados com solução contendo o inibidor desejado.

(b) Coleta de dados

Os experimentos de difração de raios-X em monocristais a alta resolução foram realizados nas linhas de Cristalografia de Proteínas do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (MX1 e MX2 - LNLS) (POLIKARPOV et al., 1998; GUIMARÃES et al., 2009) em temperatura criogênica (100 K). Cada conjunto de imagens coletado foi processado usando o programa MOSFLM (Leslie, Powell *et al.*, 2007) e escalonado com o programa SCALA (CCP4) (EVANS, 1997), separando-se 5 % das reflexões

totais para o conjunto teste (R_{free}) a ser utilizado no teste de validação cruzada (BRUNGER et al., 1992).

(c) Determinação da estrutura (faseamento)

Os conjuntos de fases iniciais, e consequente determinação das estruturas cristalográfica dos complexos LmDHODH-inibidor, foram obtidos por técnicas de substituição molecular com o programa MOLREP (VAGIN; TEPLYAKOV, 1997) utilizando as coordenadas das enzimas LmDHODH (PDB código 3GYE) depositadas no banco de dados como modelo.

(d) Refinamento

As posições atômicas do modelo gerado inicialmente, através da substituição molecular, foram modificadas de forma a satisfazer o mapa de densidade eletrônica. O modelo refinado satisfaz tanto aos parâmetros estereoquímicos, como também aos dados de difração de raios-X. O refinamento da estrutura foi realizado utilizando o programa REFMAC (BAILEY, 1994; MURSHUDOV et al., 1997) onde está implementado o princípio de máxima entropia. O programa gráfico Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004; EMSLEY et al., 2010) foi utilizado para visualização, manipulação e refinamento manual da estrutura. O ajuste manual das posições atômicas foi realizado levando-se em consideração as restrições estereoquímicas, assim como a concordância com os mapas pesados de densidade eletrônica $2F_o - F_c$ ($2mF_o - DF_c$), com σ igual a 1, e o mapa diferença $F_o - F_c$ ($mF_o - DF_c$), com σ igual a 3. F_o (hkl) corresponde ao fator de estrutura observado para a reflexão hkl e F_c corresponde ao fator de estrutura para a reflexão hkl calculado baseado no modelo. m e D são estimativas de erro para cada reflexão hkl, calculadas a partir do conjunto teste de reflexões. Após o ajuste de todos os aminoácidos na densidade eletrônica ($2F_o - F_c$), moléculas de água foram automaticamente adicionadas pelo programa Coot (EMSLEY; COWTAN, 2004; EMSLEY et al., 2010) através das posições dos picos no mapa diferença $F_o - F_c$, com σ igual a 3, e validadas através da checagem visual levando-se em consideração o ambiente químico de cada molécula de solvente. Algumas águas, que não foram encontradas automaticamente, foram adicionadas manualmente. O sucesso de cada ciclo de refinamento foi monitorado através da diminuição dos

valores de R_{factor} e R_{free} , até a obtenção de valores aceitáveis para a resolução na qual o modelo estava sendo refinado. A validação da qualidade estereoquímica do modelo obtido foi realizada no programa PROCHECK (LASKOWSKI; MACARTHUR; THORNTON, 1993; LASKOWSKI et al., 1998), onde são verificados parâmetros como comprimentos e ângulos de ligação, quiralidade, planaridade das ligações peptídicas, entre outros. Os programas gráficos Pymol (<http://www.pymol.org>) e Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>) foram utilizados para visualização, análise da estrutura e construção de imagens.

3.4.2. TcDHODH-Y-SHis

Os primeiros ensaios de cristalização da enzima TcDHODH-Y-SHis foram realizados baseando-se na condição de cristalização da enzima TcDHODH-T2, também expressa na ausência de qualquer tipo de peptídeo fusionado (INAOKA et al., 2005). Como a identidade sequencial entre as duas enzimas é altíssima, ocorrendo à mutação de apenas do resíduo Val/Phe63, decidimos por testar estas condições como ponto de partida nas nossas buscas.

Segundo INAOKA et al., 2005, os melhores cristais crescem a 4 °C com concentração de proteína igual a 10 mg/mL em tampão 10 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 1 mM orotato, e solução do poço composta por 16 % (w/v) PEG 3350, 100 mM cacodilato pH 6,2, 1 mM orotato de sódio, 50 mM de cloreto de hexaamincobalto (III) e 1 mM de tiocianato de sódio. Para tanto, a proteína TcDHODH-Y-SHis foi dialisada contra o mesmo tampão (10 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 1 mM orotato) e deixada na mesma concentração (10 mg/mL). Foram realizados ensaios varrendo várias concentrações de PEG 3350, de 14 a 18 % (w/v), mantendo constante a concentração 100 mM de cacodilato pH 6,2, 1 mM de orotato de sódio, 1 mM de tiocianato de sódio, 50 mM de cloreto de hexaamincobalto (III). Os ensaios foram realizados a 8 e 22 °C. Os experimentos foram realizados tanto pelo método de difusão de vapor em gota suspensa e sentada. Utilizou-se 500 µL e 100 µL das soluções de cristalização no reservatório. As gotas consistiram de 2 µL da solução do reservatório e de proteína (volume total da gota igual a 4 µL).

Além desta varredura inicial baseando-se na condição de cristalização da enzima TcDHODH de outra cepa de *T. cruzi*, foi também efetuada uma busca *ab initio* de uma condição de cristalização para a enzima TcDHODH-Y-SHis. Foram

testadas as 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal Screen™ e Crystal Screen 2™ (Hampton Research). Estas soluções utilizam o método de matriz esparsa e são baseadas em soluções de cristalização conhecidas para macromoléculas biológicas. Neste experimento foram testados um grande intervalo de pH, sais, precipitantes e aditivos (JANCARIK; KIM, 1991). Este ensaio foi realizado utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada, com 500 µL de solução de cristalização no reservatório, com gotas na proporção 2:2 µL (proteína:poço) e mantido a 22 °C. Análises criteriosas com relação à característica das gotas foram realizadas em busca de uma nova condição de cristalização, sem sucesso.

3.4.3. TcDHODH-Y

3.4.3.1. *Cristalização das frações I e II da enzima TcDHODH-Y*

Os primeiros ensaios de cristalização das frações I e II (denominadas depois da purificação utilizando cromatografia por afinidade) da enzima TcDHODH-Y foram realizados, para cada fração separadamente, baseando-se na condição de cristalização determinada anteriormente para esta enzima (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008). Foram testadas várias condições variando-se isopropanol (3 a 6 %), sulfato de amônio (1,2 a 1,8 M), mantendo-se constante a concentração de 0,1 M de acetato de sódio pH 5,0 e 2 mM do agente redutor DTT. Este ensaio foi realizado utilizando o método de difusão de vapor em gota suspensa, com 500 µL de solução de cristalização no reservatório, com gotas na proporção 2:2 µL (proteína:poço) e mantido a 25 °C.

Em paralelo, foi também realizada uma busca *ab initio* de uma nova condição de cristalização para ambas as frações da enzima TcDHODH-Y. Foram testadas as 98 condições disponíveis nos kits de cristalização Crystal Screen™ e Crystal Screen 2™ (Hampton Research), bem como as 48 condições disponíveis no kit de cristalização PEG/Ion Screen™ (Hampton Research). Este ensaio foi realizado utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada, com 500 µL de solução de cristalização no reservatório, com gotas na proporção 2:2 µL (proteína:poço) e mantido a 22 °C.

3.4.3.2. Cristalização robotizada da fração I da enzima TcDHODH

Além dos ensaios de cristalização padrões realizados em nosso laboratório, uma busca robotizada foi efetuada durante a realização do estágio em caráter doutorado sanduiche na University of Dundee (College of Life Science, Division of Biological Chemistry and Drug Discovery), na Escócia, sob a supervisão do Prof. Willian N. Hunter. Os experimentos foram realizados no sistema automatizado para cristalização de proteínas PhoenixTM RE da Rigaku. Foram testadas 576 diferentes condições de cristalização provenientes de seis diferentes kits de cristalização da Qiagen, como segue: AmSO4 Suite 8x12; PEGs Suite 8x12; MPD Suite 8x12; JCSG+ Suite 8x12; Classic Suite 8x12 e PGA Screen 8x12. A fração I da enzima TcDHODH-Y foi isolada, e os ensaios de cristalização foram realizados com a enzima em duas diferentes concentrações 10 e 20 mg/mL dialisada em tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl. Os experimentos foram realizados a 22 °C utilizando o método de difusão de vapor em gota sentada. Utilizou-se 60 µL das soluções de cristalização no reservatório e as gotas consistiram de 100 nL da solução do reservatório e de proteína (volume total da gota igual a 200 nL).

3.4.4. LmDHODH

Dada a dificuldade de obtenção de cristais de qualidade da enzima DHODH de *Trypanosoma cruzi*, realizamos os estudos estruturais de complexos enzima-inibidor com a enzima LmDHODH, visto que seu protocolo de cristalização foi bem estabelecido em nosso laboratório, apresentando alta reprodutibilidade e baixa fragilidade na manipulação.

As enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y compartilham 75,4% de identidade sequencial e 100 % de identidade nos aminoácidos que compõem o sítio ativo (**Figura 26**). Desta forma, utilizamos a enzima LmDHODH como modelo para a compreensão do modo de ligação dos inibidores das DHODHs de tripanossomatídeos identificados em nossos experimentos. Além da identificação do sítio de interação dos ligantes, assim como a determinação da química de interações dos compostos com a proteína alvo, nossos estudos também tinham com objetivo uma melhor compreensão do mecanismo catalítico das enzimas DHODHs pertencentes à classe 1A.

identificamos que a incorporação de moléculas maiores, como as agora selecionadas, não era possível através do uso de técnicas de "soaking". Acreditamos que devido ao tipo de empacotamento cristalino, as moléculas não conseguem se difundir pelo cristal atingindo seus sítios de interação. Sendo assim, foram realizados ensaios de co-cristalização, onde a enzima foi incubada com os ligantes previamente aos ensaios de cristalização. Nestes ensaios, a proteína foi purificada da forma padrão seguindo o protocolo descrito por FELICIANO; CORDEIRO; NONATO et al., 2006.

Previamente aos ensaios de cristalização, a enzima LmDHODH foi incubada na presença de 5 mM de cada inibidor por 24 horas, maximizando a interação enzima-inibidor. Os ensaios de cristalização com a proteína incubada com os ligantes foram realizados seguindo o protocolo descrito por (CORDEIRO; FELICIANO; NONATO, et al., 2006), e que consiste na cristalização por difusão de vapor em gota sentada a 22 °C, na presença de 1,1-1,3 M de sulfato de lítio, 0,3 - 0,45 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5.6. Os cristais dos complexos LmDHODH-inibidor foram banhados em solução crio-protetora, composta de 1,3 M de sulfato de lítio, 0,40 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5.6, acrescida de 1 mM do inibidor testado e 20 % do agente crioprotetor glicerol.

Os experimentos de difração de raios-X foram na estação DO3BMX2 - LNLS. As coletas foram realizadas em comprimento de onda, λ , igual a 1,4586 Å, e os dados registrados em um detector do tipo MarMosaic 225 (MarResearch).

3.4.4.2. Compostos provenientes da varredura por Termofluor

As moléculas responsáveis pelo aumento da estabilidade das proteínas DHODHs de tripanossomatídeos, TcDHODH-Y e LmDHODH, também foram submetidas a experimentos de co-cristalização com a enzima LmDHODH. A proteína foi purificada da forma padrão seguindo o protocolo descrito por (FELICIANO; CORDEIRO; NONATO, 2006).

Previamente aos ensaios de cristalização, a enzima LmDHODH foi incubada na presença de 1 mM de cada inibidor por 24 horas..Os ensaios de cristalização com a proteína incubada com os ligantes foram realizados seguindo o protocolo descrito por (CORDEIRO; FELICIANO; NONATO, 2006), que consiste na cristalização por difusão de vapor em gota sentada a 22 °C, na presença de 1,3 M

de sulfato de lítio, 0,3 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5.6. Os cristais dos complexos LmDHODH-ligante foram banhados em solução crioprotetora, composta de 1,3 M de sulfato de lítio, 0,40 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5.6, acrescida de 1 mM do inibidor testado e 20 % do agente crioprotetor glicerol.

Os experimentos de difração de raios-X foram na estação DO3BMX1 - LNLS. As coletas foram realizadas em comprimento de onda, λ , igual a 1,427 Å, e os dados registrados em um detector do tipo marCCD165 (MarResearch).

3.4.4.3. Compostos provenientes da varredura em biblioteca de compostos com atividade antiparasitária

As moléculas previamente identificadas como inibidores da proliferação celular em cultura de *Leishmania* e gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Flávio da Silva Emery da FCFRP - USP, e que atuaram sobre nosso alvo molecular, DHODH de tripanossomatídeos, foram submetidas a ensaios de cristalização para a avaliação estrutural das interações enzima-inibidor. A proteína foi purificada da forma padrão seguindo o protocolo descrito por (FELICIANO; CORDEIRO; NONATO, 2006). Previamente aos ensaios de cristalização, a enzima LmDHODH foi incubada na presença de 5 mM de cada inibidor por 24 horas, propiciando a interação enzima-inibidor.

Os ensaios de cristalização com a proteína incubada com os ligantes foram realizados seguindo o protocolo descrito por CORDEIRO; FELICIANO; NONATO, 2006, que consiste na cristalização por difusão de vapor em gota sentada a 22 °C, na presença de 1,3 M de sulfato de lítio, 0,3 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5.6. Os cristais dos complexos LmDHODH-ligante foram banhados em solução crio-protetora, composta de 1,3 M de sulfato de lítio, 0,40 M de sulfato de amônio, 0,1 M citrato de sódio pH5.6, acrescida de 1 mM do inibidor testado e 20 % do agente crioprotetor glicerol.

Os experimentos de difração de raios-X foram na estação DO3BMX1 e DO3BMX2 no LNLS. As coletas foram realizadas em comprimento de onda, λ , igual a 1,427 Å e 1,4586 Å, e os dados registrados em um detector do tipo marCCD165 (MarResearch) e MarMosaic 225 (MarResearch), respectivamente.

3.5. AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS INIBIDORES DAS ENZIMAS TCDHODH E LMDHODH

Através da colaboração com a Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP foram realizados experimentos para a verificação da atividade dos compostos LCPSP3027, LCPVL898 (selecionados por docagem) e SNU (selecionado por Termofluor), identificados como inibidores e ligantes das enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, diretamente contra a forma promastigota e amastigota do parasito *Leishmania braziliensis*. Além disso, também foi avaliada a citotoxicidade em células de mamíferos (em macrófagos). Estes experimentos foram realizados pela Dra. Camila Figueiredo Pinzan, pós-doutoranda do grupo da Profa. Angela K. Cruz.

4.1. PRODUÇÃO HETERÓLOGA DAS ENZIMAS DHODHs

4.1.1. LMDHODH

O protocolo de purificação da enzima LmDHODH, que consiste de uma única etapa cromatográfica em coluna de afinidade por Ni^{2+} , foi previamente implementado em nosso laboratório e reproduzido com sucesso sem alterações ao longo do desenvolvimento deste trabalho (FELICIANO; CORDEIRO; NONATO, 2006). A qualidade da proteína obtida foi adequada para a realização dos nossos experimentos de inibição e cristalização.

4.1.2. TcDHODH-Y

4.1.2.1. *Cromatografia de interação hidrofóbica*

O protocolo de purificação da enzima TcDHODH-Y, que também consiste de uma única etapa cromatográfica em coluna de afinidade por Ni^{2+} , foi previamente implementado em nosso laboratório e reproduzido com sucesso ao longo do desenvolvimento deste trabalho (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008).

Embora as análises do excelente grau de pureza e de atividade sugeriam que a proteína obtida tinha as características adequadas para a realização dos nossos estudos de inibição e cristalização, a dificuldade na obtenção dos cristais de alta qualidade para a realização dos nossos estudos de caracterização estrutural dos complexos TcDHODH-Y-ligante nos levaram a buscar novas estratégias de purificação, novas construções e diferentes estratégias de cristalização para a enzima TcDHODH-Y.

Como primeira estratégia, decidimos incorporar uma segunda etapa cromatográfica no protocolo anteriormente estabelecido. Sendo assim, após a purificação padrão da proteína TcDHODH-Y através de cromatografia por afinidade, foi introduzida uma segunda etapa cromatográfica por interação hidrofóbica, através da utilização de um gradiente linear decrescente de sal (**Figura 27**). A análise do cromatograma obtido nesta purificação, onde era possível identificar a presença de dois picos distintos, sugeriu que a enzima TcDHODH-Y clonada na construção com cauda de histidina, poderia estar sendo expressa na forma de duas populações distintas.

Figura 27: Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y por cromatografia de interação hidrofóbica com eluição realizada por gradiente decrescente de sal, utilizando duas colunas acopladas HiTrap Phenyl HP de 1mL cada (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorbância, em verde a curva da condutividade e em vermelho a curva da concentração do tampão A em função do volume de eluição.

No entanto, como observado na **Figura 27**, os parâmetros utilizados neste protocolo não eram adequados para permitir a separação dos dois picos eluídos de forma eficaz. Sendo assim, na tentativa de aperfeiçoar a separação das duas possíveis populações, foram introduzidas mudanças no protocolo originalmente testado, onde o gradiente linear decrescente de sal foi substituído por um gradiente do tipo “step”. A cromatografia por interação hidrofóbica com a eluição em “step” foi otimizada de forma a separar completamente os picos. Um exemplo de um perfil cromatográfico demonstrando o sucesso desta purificação está sendo representado na **Figura 28**. Como observado, a utilização deste novo protocolo permitiu a separação eficiente das duas populações da enzima TcDHODH-Y.

Figura 28: Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y por cromatografia de interação hidrofóbica com eluição realizada em estepes, utilizando duas colunas acopladas HiTrap Phenyl HP de 1mL cada (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorvância, em verde a curva da condutividade e em vermelho a curva da concentração do tampão B.

Uma análise inicial dos picos separados pela cromatografia de interação hidrofóbica, com eluição utilizando um gradiente em “step”, foi realizada através de SDS-PAGE – 12% (**Figura 29**). Inicialmente, conforme demonstrado na **Figura 29**, ambas as populações da enzima TcDHODH-Y apresentaram o mesmo perfil eletroforético (amostras 1 e 2 da **Figura 29**). Por este motivo, a existência destas duas populações não tinha sido identificada anteriormente para as amostras purificadas com apenas a etapa cromatográfica por afinidade (amostra 3 da **Figura 29**). A identificação destas duas diferentes populações foi o primeiro indício da razão pela qual tínhamos sérios problemas de reprodutibilidade nos experimentos de cristalização da enzima TcDHODH-Y, uma vez que estes resultados sugeriam que os ensaios cristalográficos estavam sendo executados com amostras de proteína na forma heterogênea.

Figura 29: SDS-PAGE -12%. Padrão de massa molecular (MM). Amostra 1 refere-se ao primeiro pico da cromatografia de interação hidrofóbica em "step". Amostra 2 refere-se ao segundo pico da cromatografia de interação hidrofóbica em "step". Amostra 3 refere-se à amostra de proteína antes da injeção na cromatografia de interação hidrofóbica (proteína purificada utilizando apenas a cromatografia por afinidade).

4.1.2.2. Avaliação da atividade enzimática das frações I e II

As duas frações isoladas através da introdução de uma segunda etapa cromatográfica por interação hidrofóbica foram submetidas a ensaios de atividade enzimática para avaliarmos possíveis diferenças quanto à atividade catalítica. A primeira diferença notada foi que o segundo pico eluído não apresentava coloração, em comparação com ao primeiro que apresentava a coloração amarelada, característico de proteínas que ligam FMN. Esta observação sugeria então que as amostras de proteína TcDHODH-Y, presentes no segundo pico eluído, não possuíam o cofator FMN ligado. De fato, após a realização do ensaio de atividade, verificamos que amostras provenientes das frações eluídas no segundo pico não apresentavam atividade, como observado na **Figura 30**, corroborando, assim, nossa hipótese relativa à ausência do cofator nas proteínas que compunham a segunda fração.

A diferença no perfil cromatográfico, associado à diferença de coloração e de atividade catalítica, sugere que durante os ensaios de expressão, uma porção significativa de moléculas de proteína se enovelaram sem FMN, talvez pela limitação da bactéria em produzir a coenzima FMN na quantidade suficiente para satisfazer as necessidades intrínsecas da sua maquinaria bioquímica, assim como fornecer FMN para a enzima TcDHODH-Y. Além disso, estes resultados demonstraram que a ausência do cofator poderia ter levado a um rearranjo estrutural, ainda que muito sutil, de modo a expor de forma diferente regiões hidrofóbicas e, conseqüentemente,

alterando o modo de interação das duas populações com a resina de interação hidrofóbica, possibilitando a separação das mesmas.

Figura 30: Curvas de absorvância a 300 nm em função do tempo (s). A concentração dos substratos fumarato e diidroorotato foi, respectivamente, 1 mM e 30 μ M. A curva em preto representa a medida da formação de orotato em função do tempo utilizando a enzima TcDHODH-Y eluída no primeiro pico. A curva em vermelho demonstra que não ocorre formação de produto quando é utilizada a enzima TcDHODH-Y eluída no segundo pico.

Com base nos resultados obtidos, todos os ensaios de inibição, cristalização e busca de ligantes *in vitro* realizados para a enzima TcDHODH-Y foram aplicados com amostras protéicas isoladas com base neste novo protocolo de purificação.

4.1.3. TcDHODH-Y-SHIs

4.1.3.1. Clonagem da enzima TcDHODH-Y-SHIs

A amplificação do gene que codifica a enzima TcDHODH-Y (942 pares de bases) por reação de PCR a partir de amostra da construção TcDHODH-Y-pET28a(+) foi realizada com sucesso através da amplificação de um fragmento único de aproximadamente 1 kb (**Figura 31**). Inicialmente foram testados perfis termais diferentes com o objetivo de encontrar a melhor temperatura de anelamento para os oligonucleotídeos utilizados (**Figura 31(a)**). Os oligonucleotídeos foram desenhados com base na sequência da TcDHODH-Y de forma a permitir a amplificação do gene de interesse e a inserção dos sítios de restrição para as enzimas *Nco*I e *Not*I. Os resultados indicaram que os oligonucleotídeos utilizados se

anelaram especificamente ao nosso gene de interesse, independente das diferentes temperaturas testadas (**Figura 31(a)**). Para os experimentos subsequentes, escolhemos a temperatura de anelamento de 55 °C e repetimos as reações de PCR (**Figura 31(b)**). O produto de PCR foi excisado do gel, purificado e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm. A concentração obtida foi de 70 ng/μL.

Figura 31: Gel de agarose 0,8 % (m/v). **(a)** Amplificação do gene TcDHODH-Y por reação de PCR a partir de amostra de DNA da construção TcDHODH-Y-pET28a(+), variando a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos. M - Marcador 1 Kb DNA Ladder (Biolab) **(b)** Amplificação do gene de interesse por reação de PCR usando temperatura de anelamento de 55 °C.

O produto de PCR e o vetor de expressão pET28a(+) foram digeridos com as enzimas de restrição *Nco*I e *Not*I e submetidos a reações de ligação. Os produtos de ligação foram transformados em bactéria competentes *E. coli* cepa DH5α e as colônias obtidas analisadas por reações de PCR de colônia. Um único clone positivo foi obtido e submetido à extração do DNA plasmidial. O plasmídeo foi purificado, e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm. O plasmídeo recombinante isolado foi transformado em bactéria competente *E. coli* cepa BL21(DE3) para os ensaios de expressão subsequentes.

4.1.3.2. Teste de expressão e expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis

O ensaio de expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis foi realizado em *E. coli* cepa BL21(DE3) (Novagen) com temperatura de indução igual a 25 °C, variando-se o tempo de indução e a concentração de IPTG. O perfil de expressão

obtido após os diferentes períodos de expressão e concentrações do agente indutor (IPTG) se encontra representado na **Figura 32**.

Figura 32: SDS-PAGE-12%. Ensaio de expressão a 25°C para a construção TcDHODH-Y-SHis (~34kDa) variando o tempo de indução (5 e 20 horas) e a concentração de IPTG (0; 0,1; 0,5 e 1,0mM). Os retângulos em amarelo indicam as bandas de expressão da proteína na forma solúvel. MM representa o padrão de massa molecular. A figura representa o experimento realizado com **(a)** 5 horas de indução e **(b)** 20 horas de indução.

A análise da **Figura 32** indicou que a expressão da proteína praticamente independia da concentração de IPTG, pois mesmo com a menor concentração do agente indutor testada (0,1 mM de IPTG), a indução da expressão foi suficiente para alcançar um alto nível de expressão da proteína de interesse. Também não foi observado variação significativa quanto aos níveis de expressão quando comparando 5 e 24h. Com base nos resultados obtidos, decidimos estabelecer um protocolo de expressão recombinante para TcDHODH-Y-SHis e que consistia em um experimento de expressão por 5 horas induzido com 0,1 mM de IPTG a 25°C. Essas condições foram mantidas para todos os ensaios de expressão da enzima TcDHODH-Y-SHis realizados em larga escala.

4.1.3.3. *Purificação da enzima TcDHODH-Y-SHis*

Para alcançarmos o grau de pureza necessário para a realização dos nossos experimentos, foi necessária a implementação de um protocolo de purificação que consistiu de três diferentes etapas cromatográficas: cromatografia de

troca aniônica, seguida de uma cromatografia de interação hidrofóbia e, por fim, uma cromatografia por exclusão molecular, como detalhado a seguir.

(a) Cromatografia de Troca Aniônica

O perfil cromatográfico obtido a partir da purificação da fração solúvel do extrato bruto da bactéria, utilizando cromatografia de troca aniônica se encontra representado na **Figura 33**. O primeiro pico (I) presente no cromatograma refere-se ao material que não se ligou à matriz da resina. Ao iniciar o gradiente de eluição, vinte e duas frações de 1 mL cada foram coletadas. Os tubos 3 e 5 (referentes ao pico II), 6 a 14 (referentes ao pico III) e 16, 18 e 20 (referentes ao pico IV) foram analisados por SDS-PAGE – 12% (**Figura 34**).

Figura 33: Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y-SHis por cromatografia de troca aniônica, utilizando a coluna C10/10 contendo 10 mL da resina DEAE-FF (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorvância, em vermelho a curva da condutividade e em verde a curva da concentração do tampão B, que variou de 0 a 100% em 60mL de corrida. As frações estão representadas em vermelho com as respectivas numerações dos tubos coletados.

A análise por SDS-PAGE indicou que a proteína TcDHODH-Y-SHis, eluia continuamente com a adição de sal, saindo majoritariamente entre os tubos 6 a 14 quando a porcentagem do tampão B era de 48,4% (pico III). As amostras contidas nos tubos 6 a 14 foram concentradas para a próxima etapa cromatográfica.

Figura 34: SDS-PAGE-12%. **(a)** Padrão de massa molecular (MM) e amostras dos tubos 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. **(b)** Padrão de massa molecular (MM), amostra da proteína antes de ser injetada na purificação (inj) e amostras dos tubos 13, 14, 16, 18 e 20. TcDHODH-Y-SHis migra com massa molecular de aproximadamente 34 kDa.

(b) Cromatografia de Interação Hidrofóbica

O perfil cromatográfico obtido para a cromatografia de interação hidrofóbica utilizada como segunda etapa de purificação da enzima TcDHODH-Y-SHis se encontra representado na **Figura 35**. O primeiro pico (I) presente no cromatograma refere-se ao material que não se ligou à matriz da resina. Ao iniciar o gradiente de eluição, vinte frações de 1 mL cada foram coletadas. Os tubos 2 a 5 (pico II), 6 a 9 (pico III) e 10 a 18 (picos IV e V) foram analisados por SDS-PAGE – 12% (**Figura 36**). A análise por SDS-PAGE indicou que a proteína TcDHODH-Y-SHis, eluia majoritariamente quando a porcentagem do tampão B era de 85,9, referente aos picos IV e V (tubos 10 a 18). No entanto, o ombro observado no perfil de eluição (picos IV e V) sugeria a presença de duas populações, como anteriormente observado para a enzima da construção TcDHODH-Y, anteriormente descrita. As amostras contidas nos tubos 10 a 12, referentes ao pico IV, foram combinadas e concentradas para a próxima etapa cromatográfica.

Figura 35: Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y-SHis por cromatografia de interação hidrofóbica, utilizando a coluna HiTrap Phenyl HP de 1mL (Amersham Bioscience). Em azul está representada a curva de absorbância, em vermelho a curva da condutividade e em verde a curva da concentração do tampão B, que variou de 0 a 100% em 25mL de corrida. As frações estão representadas em vermelho com as respectivas numerações dos tubos coletados.

Figura 36: SDS-PAGE-12%. **(a)** Padrão de massa molecular (MM), amostra antes de ser injetada na purificação (inj) e amostras dos tubos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13. **(b)** Amostras dos tubos 2, 3, 4, 5, padrão de massa molecular (MM) e amostras dos tubos 14, 15, 16, 17 e 18. TcDHODH-Y-SHis migra com massa molecular de aproximadamente 34 kDa

(c) Cromatografia por Filtração em Gel

O perfil cromatográfico obtido para a cromatografia por filtração em gel utilizada como terceira etapa de purificação da enzima TcDHODH-Y-SHis se

encontra representado na **Figura 37**. A proteína eluiu com pico único e simétrico, embora relativamente largo. Amostras dos tubos 13 a 17 foram analisadas por SDS-PAGE – 12%, que indicaram a pureza da proteína TcDHODH-Y-SHis após a cromatografia por filtração em gel (**Figura 38**).

Figura 37: Perfil cromatográfico da purificação de TcDHODH-Y-SHis por cromatografia de filtração em gel, utilizando a coluna Sephacryl™ S-100. Em azul está representada a curva de absorbância. As frações estão representadas em vermelho com as respectivas numerações dos tubos coletados.

Figura 37: SDS-PAGE-12%. Padrão de massa molecular (MM) e amostras dos tubos 13, 14, 15, 16 e 17. TcDHODH-Y-SHis migra com massa molecular de aproximadamente 34 kDa.

Amostras da proteína produzida com base nesta nova construção foram utilizadas para os ensaios de inibição enzimática e também de cristalização.

4.1.4. HsDHODH

4.1.4.1. Clonagem da enzima HsDHODH

A propagação do gene que codifica a enzima HsDHODH foi realizada com sucesso através do cultivo de células de *E. coli* DH5 α transformadas com o plasmídeo HsDHODH-pET22b. O plasmídeo HsDHODH-pET22b e o vetor de expressão pET28a(+) foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I. A eficiência da digestão foi monitorada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v). Como podemos notar na **Figura 38**, o vetor de expressão pET28a(+) (aproximadamente 5,4 kb) foi aberto, enquanto que o plasmídeo HsDHODH-pET22b (aproximadamente 6,4 kb) foi parcialmente digerido. No entanto, apesar da digestão do gene que codifica a proteína HsDHODH não ter sido totalmente eficiente, a porção do fragmento digerida com sucesso foi suficiente para ser excisado do gel e purificado utilizando o kit de purificação QIAquick Gel Extraction (Qiagen).

Figura 38: Gel de agarose 0,8% (m/v). As duas primeiras colunas correspondem ao produto de digestão do plasmídeo HsDHODH-pET22b digerido com as enzimas de restrição *Nde*I e *Xho*I. Os retângulos em amarelo correspondem ao gene da enzima HsDHODH que foi excisado do gel para purificação. A terceira coluna (M) corresponde ao Marcador 1 Kb DNA Ladder (Biolab): 10; 8; 6; 5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5 e 0,25 kb. A quarta e quinta coluna corresponde ao produto de digestão do vetor de expressão pET28a(+) digerido com as enzimas *Nde*I e *Xho*I.

O inserto purificado e o vetor de expressão pET28a(+) digerido, foram submetidos a reação de ligação. Os produtos de ligação foram transformados em bactéria competentes *E. coli* cepa DH5 α e as colônias obtidas foram analisadas por reações de PCR de colônia. O único clone positivo obtido foi submetido à extração do DNA plasmidial. O plasmídeo foi purificado com o kit de purificação Wizard *Plus*

SV Minipreps (Promega) e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 260 nm. Para os ensaios de expressão subsequentes, o plasmídeo isolado foi transformado em bactéria competente *E. coli* cepa BL21(DE3).

4.1.4.2. Teste de expressão da enzima HsDHODH

O ensaio de expressão da enzima HsDHODH foi realizado em *E. coli* cepa BL21(DE3), com temperatura de indução igual a 25 °C, diferentes tempo de indução variado (3, 6 e 20 horas) e de concentração de IPTG (5; 100 e 500 μ M). O monitoramento do perfil de expressão protéica para diferentes horas de indução e diferentes concentrações de IPTG está representado na **Figura 39**.

Figura 39: SDS-PAGE-12%. Ensaios de expressão a 25°C para a construção HsDHODH (~44kDa) variando o tempo de indução (3, 6 e 20 horas) e a concentração de IPTG (5, 100 e 500 μ M). Os retângulos em amarelo indicam as bandas de expressão da proteína na forma solúvel. MM representa o padrão de massa molecular. Na figura está representado o resultado do experimento realizado com **(a)** 3 horas de indução, **(b)** 6 horas de indução e **(c)** 20 horas de indução.

A análise da **Figura 39** indicou que a expressão da proteína só pode ser visualizada com concentrações de IPTG testadas para valores iguais ou superior a 100 μ M. Além disso, o tempo de indução também foi um parâmetro importante a ser observado, uma vez que a expressão da proteína praticamente duplicava quando passávamos de 3 para 6 horas de indução. Além disso, para tempos longos de indução, 20 horas, também notamos um aumento sutil na quantidade de proteína expressa. Analisando os resultados e ponderando parâmetros como tempo de produção da proteína recombinante, rendimento e solubilidade, decidimos por implementar um protocolo de expressão e purificação da HsDHODH onde a indução da expressão da enzima HsDHODH deveria ser realizada por 6 horas com a

utilização de 500 μM de IPTG a 25 °C. Essas condições foram às escolhidas para os ensaios de expressão em larga escala.

4.1.4.3. Purificação da enzima HsDHODH

A expressão de HsDHODH foi induzida por 500 μM de IPTG, a 25 °C por 6 horas. A purificação da enzima HsDHODH foi realizada em uma única etapa que envolvia a utilização de cromatografia por afinidade em resina de Níquel. As eluições obtidas com 250 mM de imidazol no processo de purificação foram analisadas por SDS-PAGE – 12% (**Figura 40**). Após concentradas as amostras, a estimativa da concentração foi realizada através da estimativa da concentração de FMN na solução. Sabendo-se que cada domínio da DHODH possui uma molécula de FMN ligada, estimamos a concentração da proteína em função da concentração de FMN. Após a determinação da curva padrão, obtida a partir da leitura dos valores de absorbância a 450 nm de amostras de FMN, os parâmetros da reta foram determinados, sendo o parâmetro "a" igual a $0,03939 \pm 0,00049$ e "b" igual a $0,00702 \pm 0,00002$. Utilizando os valores da equação da reta obtida e o valor da absorbância medida a 450 nm para a amostra de proteína HsDHODH, a concentração da proteína, medida pela concentração de FMN ([FMN]), foi determinada. Em um exemplo, onde a medida de absorbância da amostra de proteína foi igual a 0,617 (unidades de absorbância), a concentração calculada foi de 82,28 μM , que corresponde a 3,7 mg/mL, uma vez que 1 mg/mL de HsDHODH corresponde a 22 μM . Embora o rendimento fosse considerado relativamente baixo (3,5mg/2L de cultura) quando comparado com os nossos experimentos para a expressão de DHODH de outros organismos o protocolo de purificação foi eficiente.

Figura 40: SDS-PAGE-12%. Padrão de massa molecular (MM) e perfil das eluições com 250 mM imidazol.

4.2. OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DE PARTIDA

4.2.1. VARREDURA *IN SILICO* EM BIBLIOTECA DE COMPOSTOS

4.2.1.1. Identificação de sítios alvos nas DHODHs de tripanossomatídeos

A análise comparativa entre as características estruturais e funcionais das diferentes enzimas LmDHODH, TcDHODH-Y e a homóloga humana, permitiu a identificação de cinco diferentes sítios (denominados de S1 a S5) cuja forma, volume e localização nos levou a investigá-los como potenciais sítios a serem explorados para o desenho de inibidores seletivos para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH (**Figura 41**). Estas regiões foram denominadas como: o sítio ativo (S1); uma extensão do S1 (S2); o sítio localizado atrás da alça catalítica (S3); uma extensão do sítio S3 (S4); e a cavidade encontrada na interface dimérica (S5) (**Figura 41**).

Figura 41: Representação em estéreo das cavidades identificadas como potenciais sítios para os experimentos de varredura virtual de moléculas bioativas. A superfície representada em cinza claro corresponde a um monômero A e em cinza escuro ao monômero B da enzima TcDHODH. Em rosa está representado o sítio ativo (S1) que não se encontra exposto à superfície da proteína; em azul está representado o sítio S2 adjacente ao sítio catalítico; em laranja está representado o sítio S3 também adjacente ao sítio catalítico; em verde o sítio S4 que é complementar ao sítio S3 e é formado por resíduos de ambos os monômeros; em vermelho o sítio S5 localizado na interface dimérica. Entre os sítios S2 e S3 encontra-se a alça catalítica representada na forma de "ribbon" transparente. Figura gerada no programa Pymol.

Os resíduos que compõem os sítios S1 a S5 estão compilados na **Tabela 8** e as hipóteses que correlacionam estas cavidades com a atividade enzimática se encontram detalhadas a seguir.

Tabela 8: Lista dos resíduos presentes em cada um dos sítios selecionados (S1, S2, S3, S4, S5) nas enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y e os estruturalmente equivalentes na enzima humana. A numeração utilizada é referente à da enzima LmDHODH. Em amarelo estão selecionados os resíduos da enzima TcDHODH-Y que se diferem dos da enzima LmDHODH. Em verde estão grifados os resíduos da enzima humana que diferem de ambas as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH

	LmDHODH	TcDHODH-Y	HsDHODH		LmDHODH	TcDHODH-Y	HsDHODH
S1	Lys44	Lys	Lys	S3	Ser130	Ser	Ser
	Asn68	Asn	Asn		Pro132	Pro	Pro
	Met70	Met	Tyr		Val134	Val	Thr
	Gly71	Gly	Gly		Pro135	Pro	Ala
	Leu72	Leu	Phe		Gly136	Gly	Gly
	Asn128	Asn	Asn		Lys137	Lys	Leu
	Cys131	Cys	Ser		Pro138	Pro	Arg
	Pro132	Pro	Pro		Gln139	Gln	Ser
	Asn133	Asn	Asn		Tyr142	Tyr	Gly
	Asn195	Asn	Asp		Pro167	Pro	Pro
	Ser196	Ser	Gly		Pro168	Pro	Ala
					Phe172	Ile	Lys
S2	Leu72	Leu	Phe		Asn195	Asn	Asp
	Ser100	Ser	Leu		Ser196	Ser	Gly
	Gly101	Gly	Gly		Gly198	Gly	Ile
	Leu102	Leu	Val		Asn199	Asn	Val
	Asn107	Asn	Asn		Lys215	Lys	Arg
	Asn128	Asn	Asn	S5	Tyr142	Tyr	Gly
	Leu129	Leu	Val		Phe144	Phe	Ala
	Ser130	Ser	Ser		Tyr169	Tyr	Val
	Cys131	Cys	Ser		Phe170	Phe	Leu
	Val134	Val	Thr		Asp171	Asp	Val
	Lys137	Lys	Leu		His174	His	Ala
	Pro138	Pro	Arg				
	Gln139	Gln	Ser				
	Val140	Val	Leu				
	Cys150	Tyr	Leu				
S4	Phe172	Ile	Lys				
	Phe175	Phe	Pro				
	Lys215	Lys	Arg				
	Gln216	Gln	Ser				
	Phe218	Phe	Thr				
	Ala236	Ala	Glu				
	Arg239	Arg	Ala				
	Arg240	Arg	Leu				

A primeira região a ser avaliada foi a região correspondente ao sítio ativo (S1). Inicialmente, um alinhamento estrutural entre a região do sítio ativo (S1) das enzimas DHODH de *T. cruzi*, *L. major* e humana, mostrou que o perfil de interações do reconhecimento molecular do substrato é altamente conservado entre as duas

classes das DHODHs. No entanto, além da mutação do resíduo catalítico, de cisteína nas enzimas de TcDHODH (Cys130) e LmDHODH (Cys131), para serina na enzima humana (Ser215), outras importantes variações pontuais foram encontradas entre as diferentes classes das DHODHs, como a presença de uma treonina (Thr285) e de uma fenilalanina (Phe149) na enzima humana em substituição aos resíduo de serina (Ser195 em TcDHODH e Ser196 em LmDHODH) e de leucina (Leu71 em TcDHODH e Leu 72 em LmDHODH), que introduzem importantes variações quanto a natureza química e estérica desta cavidade, e que possibilitam a busca de moléculas seletivas para as enzimas de tripanosomatídeos **Figura 42**.

Figura 42: Interações entre DHODH e o produto da reação, orotato. Resíduos presentes na enzima humana estão representados em fonte negrito, da enzima TcDHODH em fonte normal e da enzima LmDHODH em fonte itálico. Figura foi gerada baseando-se na estrutura tridimensional, depositadas no PDB, das enzimas complexadas com o produto da catálise: 2FPV (humana), 2E68 (*T. cruzi* cepa Tulahuen gene 2) e 3GZ3 (*L. major*). Selecionados com uma caixa em amarelo estão representados os resíduos que não apresentam identidade sequencial entre as enzimas DHODHs das diferentes classes. Figura adaptada de CHELESKI et al., 2010.

Além disso, foi possível observar que apesar do sítio ativo aparentemente ser restrito a acomodação de moléculas pequenas, como o orotato, a abertura da alça catalítica permite a abertura de um canal de acesso ao sítio ativo envolvendo os sítios S2 e S3-S4 e possibilitando a acomodação de moléculas maiores que o orotato. Uma vez que estes sítios ao redor da alça catalítica apresentam diferenças significativas entre as DHODHs de diferentes classes, ligantes poderiam ser planejados para crescer do sítio ativo na direção destes canais, aumentando a afinidade e seletividade para as enzimas de TcDHODH e LmDHODH.

A princípio, o crescimento de moléculas em direção ao carbono C5 do orotato (**Figura 42**) representou uma boa estratégia para os primeiros ensaios de varredura de ligantes, uma vez que é nesta direção que encontramos uma das principais diferenças relacionadas à composição de aminoácidos no sítio ativo entre a enzima humana e de tripanossomatídeos.

Outra característica estrutural marcante das enzimas DHODHs é bastante relevante para as nossas análises topológicas é a presença de uma alça, denominada alça catalítica, altamente flexível e conservado nas DHODHs de ambas as classes. Tal flexibilidade pode ser observada nas estruturas cristalográficas da enzima LmDHODH na forma nativa (3GYE) e em complexo com o orotato (PDB código 3GZ3) (CORDEIRO et al, 2012) onde esta região correspondente aos resíduos Ser130 a Tyr142 nem mesmo pode ser modelada. Além disso, a flexibilidade desta região já tinha sido identificada anteriormente nas estruturas cristalográficas das outras enzimas DHODHs, que apesar de possuírem a alça catalítica bem modelada, estes apresentavam elevados fatores de temperatura (INAOKA et al., 2008). A flexibilidade desta alça demonstra seu importante papel no mecanismo catalítico das DHODHs, pois sua movimentação é responsável por permitir e controlar a entrada do substrato e saída do produto da reação.

Inicialmente, devido à similaridade compartilhada entre membros da classe 1A e 2, acreditávamos que regiões que envolvessem a alça catalítica, poderiam não ser atraentes para serem exploradas no planejamento de inibidores seletivos. No entanto, após cuidadosas análises estruturais entre a enzima TcDHODH e HsDHODH, identificamos que ao redor da alça catalítica existem sítios (exemplo, sítios S2 e S3-S4) cuja composição de aminoácidos difere drasticamente entre as enzimas DHODHs de ambas as classes. Em nossas análises, observamos

que a presença destes sítios ao redor da alça catalítica está relacionada à necessidade de espaço que permita a movimentação da alça durante a catálise (**Figura 41**). Nossa hipótese para explorarmos estes sítios é baseada na idéia de que moléculas que interajam nestes sítios possam inibir a atividade enzimática das DHODHs através da interferência na mobilidade da alça catalítica. Nesta panorâmica, onde há evidências de que a mobilidade da alça catalítica é crucial para a atividade enzimática e que os sítios (S2, S3-S4) possuem diferenças importantes entre a LmDHODH/TcDHODH e a humana, acreditamos na possibilidade de que moléculas planejadas para interferir na mobilidade da alça catalítica sejam fortes candidatas a potenciais inibidores da DHODH das classe 1A.

Embora os sítios S2 e S3-S4 sejam muito próximos ao sítio catalítico, as estruturas disponíveis no banco de dados de proteína não nos permitia identificar e caracterizar a conectividade entre estas cavidades e o sítio ativo. Vale ressaltar, que como consequência das forças de empacotamento cristalino, a maioria das estruturas cristalográficas disponíveis apresentavam a alça na conformação fechada, ou em alguns casos, devido a alta mobilidade, os resíduos eram totalmente omitidos, impossibilitando assim a visualização das diferentes possíveis conformações que a alça catalítica poderia adotar e, portanto as diferentes características que os sítios S2 e S3-S4 poderiam assumir. No entanto, nossas análises estruturais evidenciavam que o único canal de acesso ao sítio catalítico era através de uma destas duas cavidades (S2 ou S3-S4), mais um fator que sugeria a importância destes sítios para o planejamento de ligantes para estas regiões, uma vez que moléculas que se ligassem nestas regiões poderiam não somente por interferir na mobilidade da alça catalítica, como também bloquear a entrada do substrato no sítio ativo.

Uma das principais diferenças estruturais entre as classes 1A e 2 das enzimas DHODHs, está intimamente ligada ao estado oligomérico destas diferentes enzimas. Desta forma, quando da utilização de estratégias racionais no planejamento de ligantes, sítios que possuam qualquer tipo de relação com a forma dimérica das enzimas DHODHs da classe 1A, merecem uma atenção especial, como por exemplo, os sítios S4 e S5 (**Figura 41**). Ainda mais relevante que isto, estudos de mutagênese sítio dirigida utilizando a enzima homóloga da bactéria *Lactococcus lactis*, mostraram que a atividade catalítica das enzimas da classe 1A é

dependente da forma oligomérica (OTTOSEN et al., 2002). Mais recentemente, estudos utilizando a técnica de “single molecule” sugeriram que os dois monômeros do dímero não funcionam ao mesmo tempo e que a reação enzimática ocorre em um sítio de cada vez. Estes resultados também corroboram a importância da interface dimérica para a função enzimática, possibilitando assim a troca de informação entre os monômeros durante o mecanismo de catálise. Sendo assim, é razoável nesta etapa do projeto especular a relevância em explorarmos regiões envolvidas na interface dimérica (exemplo, sítio S5), ou nas proximidades (exemplo, sítio S4) para o planejamento de inibidores específicos para a classe 1A.

4.2.1.2 DHODHs de tripanossomatídeos

Uma análise comparativa entre as estruturas primárias de LmDHODH, TcDHODH-Y, assim como também uma comparação com as DHODHs de outros tripanossomatídeos, revelam que a identidade sequencial entre as enzimas desta família de parasitos varia de 73 a 76% quando comparamos LmDHODH com as enzimas homólogas presentes em organismos do gênero *Trypanosoma*, e 83 a 96 % quando comparamos com as DHODHs de outras espécies de *Leishmania* (**Figura 43**). Além disso, de um modo geral, as enzimas de tripanossomatídeos compartilham em torno de 50% de identidade sequencial com outros membros da família 1A e de 18 a 27 % quando comparadas com as enzimas da classe 2. Em particular, as enzimas de tripanossomatídeos compartilham em torno de 25% de identidade sequencial com a enzima humana.

Quando comparamos a enzima LmDHODH contra todas as sequências e estruturas das DHODHs de tripanossomas, nos encontramos que todos os sítios (S1 a S5) são altamente conservado em termos de conformação e natureza química (**Figura 43**). Os sítios S1, S3 e S5 são encontrados totalmente conservados e apenas algumas pequenas substituições são encontradas nos sítios S4 e S2. No sítio S4 uma única mutação pode ser observada em espécies de *Leishmania*, onde a Ile172 encontrada nas DHODHs de *T. cruzi* e *T. brucei* é trocada por uma Phe172 (**Figura 43**). Como resultado, o sítio S4 é ligeiramente mais raso nas estruturas de *Leishmania*. O sítio S2 a Leu102 altamente conservada é trocada pela Phe102 em *L. braziliensis* DHODH e o resíduo Asn107 é trocado pela Ser107 em *T. brucei* DHODH. Apesar destas poucas substituições, o perfil das interações para o

reconhecimento molecular é mantido conservado nas cavidades S2 e S4 nas DHODHs de tripanossomatídeos. O único ponto de mutação que merece uma atenção especial é a Tyr150 que é encontrada substituída pela Cys150 na maioria das espécies de *Leishmania* com exceção da *L. braziliensis* (Figura 43). As diferenças no volume, geometria da sua cadeia lateral no sítio S2, e o caráter altamente reativo deste resíduo de cisteína livres poderia conduzir para uma via alternativa para o desenho de inibidores seletivos que cobre um espectro grande das DHODHs de *Leishmania*.

Figura 43: Alinhamento sequencial das enzimas DHODHs de diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* demonstrando a alta identidade sequencial dividida entre essas enzimas. Na parte superior do sequenciamento estão representados os elementos de estrutura secundária correspondentes à enzima LmDHODH. Na parte inferior do sequenciamento estão marcados com asteriscos os resíduos envolvidos nos diferentes sítios: S1 (rosa); S2 (azul); S3 (laranja); S4 (verde) e S5 (vermelho). O alinhamento foi realizado no programa MultAlin e a figura construída no programa ESPrit. Figura cedida gentilmente pela aluna de doutorado Patrícia Rosa Feliciano da FCFRP-USP.

Estes resultados além de ressaltarem a possibilidade de planejarmos moléculas seletivas para as enzimas de tripanossomatídeos, também sugerem fortemente que moléculas planejadas para inibir TcDHODH e/ou LmDHODH, desenvolvidos no presente projeto, poderão também atuar como inibidores de DHODHs de outros tripanossomatídeos.

4.2.1.3. Varredura virtual de moléculas bioativas - Primeira Geração

A primeira tentativa de identificação de ligantes, por varredura virtual em biblioteca de compostos, foi realizada utilizando como receptor a enzima TcDHODH-Y. Os resultados obtidos foram provenientes do uso de 3 diferentes estratégias, como detalhadas a seguir.

4.2.1.3.1. Varredura virtual de ligantes – Estratégia I

O banco de moléculas ZINC inicialmente utilizado continha 8.720.837 moléculas. Após a primeira etapa de filtragem obtivemos uma sub-coleção contendo 2.800.785 moléculas que foi submetida aos métodos de busca virtual de compostos bioativos, baseado na estrutura do receptor (TcDHODH-Y). Após a realização do consenso entre as moléculas mais bem pontuadas por cada programa, FlexX e FRED, um total de 3.000 moléculas foram submetidas a docagem no programa GLIDE, onde as 100 moléculas mais bem pontuadas foram inspecionadas visualmente.

Para o sítio S5, os resultados foram bastante insatisfatórios. Não foi possível identificarmos moléculas docadas completamente dentro do sítio, isto porque este sítio é composto de uma cavidade muito pequena, o que impossibilitou a acomodação dos ligantes em seu interior e, portanto, não foi possível identificar nenhuma molécula para este sítio através de técnicas de docagem.

Para o sítio S3-S4, conseguimos identificar várias moléculas com conformações favoráveis no sítio de ligação. As três moléculas (LCPEN355, LCPEN484 e LCPSP726) que demonstraram uma melhor interação com o sítio S3-S4 (**Figura 44, 45 e 46**) foram selecionadas para serem compradas e, posteriormente, submetidas aos ensaios de inibição enzimática e também aos ensaios de caracterização estrutural.

Figura 44: Representação do modo de interação da molécula LCPEN385 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia I de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanosomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 45: Representação do modo de interação da molécula LCPEN484 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia I de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanosomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 46: Representação do modo de interação da molécula LCPSP726 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia I de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanosomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

4.2.1.3.2. Varredura virtual de ligantes – Estratégia II

Nesta estratégia os sítios S1 e S3-S4 foram explorados, utilizando-se dois diferentes bancos de moléculas. O banco de moléculas ZINC/fragment-like (utilizado na docagem no sítio S1) e ZINC/lead-like (utilizado na docagem no sítio S3-S4) continha 435.539 e 2.720.002 moléculas, respectivamente. Após docagem no programa DOCK 3.5, as 100 moléculas mais bem pontuadas foram inspecionadas visualmente. As três moléculas (LCPEN048, LCPEN054 E LCPEN352) que demonstraram uma melhor interação com o sítio S3-S4 (**Figuras 47, 48 e 49**), e as três (LCPSA407, LCPSA460 E LCPEN889) que demonstraram uma melhor interação com o sítio S1 (**Figuras 50, 51 e 52**) foram selecionadas para serem compradas e, posteriormente, submetidas aos ensaios de inibição enzimática e também aos ensaios de caracterização estrutural.

Figura 47: Representação do modo de interação da molécula LCPEN048 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia II de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 48: Representação do modo de interação da molécula LCPEN054 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia II de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos nas três enzimas e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 49: Representação do modo de interação da molécula LCPEN352 com os sítios S3-S4 preditos pela estratégia II de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em vermelho são distintos entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 50: Representação do modo de interação da molécula LCPSA407 com o sítio S1 preditos pela estratégia II de docagem. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 51: Representação do modo de interação da molécula LCPSA460 com o sítio S1 preditos pela estratégia II de docagem. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 52: Representação do modo de interação da molécula LCPEN889 com o sítio S1 preditos pela estratégia II de docagem. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

4.2.1.3.3. Varredura virtual de ligantes – Estratégia III

Através da docagem, focando o sítio S1, realizada utilizando o programa AutoDock 4.0, pelo aluno Josmar Rodrigues da Rocha, do laboratório NEQUIMED-PN, localizado no Instituto de Química de São Carlos - USP, moléculas análogas ao produto da catálise, orotato, foram selecionadas (**Figura 53**) e posteriormente

utilizadas para os ensaios de inibição enzimática por ITC e também aos ensaios de caracterização estrutural (CHELESKI et al., 2010).

Figura 53: Representação das dez estruturas químicas das moléculas selecionadas para os estudos inibitórios contra a enzima TcDHODH-Y. Nesta ilustração, a molécula **3** corresponde ao produto da catálise, orotato, estão representadas as numerações dos átomos pertencentes à molécula. Figura gerada no programa MarvinSketch (<http://www.chemaxon.com>).

4.2.1.3. Varredura virtual de moléculas bioativas - Segunda Geração

Os resultados obtidos para os compostos desenvolvidos na primeira etapa do projeto e, denominados de compostos de primeira geração, foram utilizados para desenvolver a segunda geração de ligantes, cujos estudos por varredura virtual em biblioteca de compostos, foram realizadas utilizando como receptor a enzima LmDHODH.

Para estes estudos, moléculas testes foram obtidas a partir de um banco de moléculas comerciáveis, construído pela Profa. Ruth Brenk da Universidade de Dundee, contendo aproximadamente seis milhões de compostos. Após a primeira etapa de filtragem, o banco de dados foi reduzido para um total de 170.000 moléculas. Estas moléculas foram submetidas a uma nova etapa de filtragem, cujo novo princípio para exclusão foi baseado na seleção de compostos que possuísem características químicas que favorecessem a interação dos mesmos com a proteína. A posição e características químicas e estéricas dos grupos químicos considerados relevantes foram previamente identificadas na estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH em complexo com o inibidor obtido na primeira geração, ácido 5-nitroorótico (CHELESKI et al., 2010). Como ilustrado na **Figura 54**, para esta nova

busca foram selecionadas apenas moléculas que poderiam efetuar pelo menos duas das três interações conservadas, baseadas no modelo farmacofórico e que envolvem três ligações de hidrogênio. Desta forma, o banco de dados final para os experimentos de varredura virtual foi reduzido para 31.320 moléculas.

Figura 54: Representação das interações entre o inibidor ácido 5-nitroorótico e o sítio S1 da enzima LmDHODH. Conforme demonstrado, o sítio ativo possui duas regiões doadoras de hidrogênio (esferas em azul) e uma região aceptora de hidrogênio esfera em vermelho), que são responsáveis pela interação com as duas regiões aceptoras de hidrogênio e uma região doadora de hidrogênio, presentes no ligante encontrado no sítio ativo.

Uma etapa crucial na docagem da segunda geração de ligantes foi a modelagem da alça catalítica de forma a permitir o mapeamento dos bolsões (S2 e S3 e S4) que poderiam dar acesso ao sítio ativo (S1). A busca de várias conformações da alça catalítica foram realizadas com o programa PLOP. Escolhemos para os experimentos de docagem a conformação da alça catalítica na qual era possível observar uma extensão do sítio ativo na direção ao carbono C5 do orotato, de forma a favorecer a identificação de ligantes que pudessem crescer nesta direção.

Das moléculas docadas, as 500 mais bem pontuadas foram analisadas visualmente, e sete delas (LCPVL480, LCPVL604, LCPVL682, LCPVL900, LCPVL161, LCPSP3027 e LCPVL898) que demonstraram uma melhor interação com o sítio (**Figura 55 a 61**), e que mantinham interações com resíduos não conservados entre as classes 1A e 2 das DHODHs, foram adquiridas para os ensaios de inibição enzimática e caracterização estrutural.

Figura 55: Representação do modo de interação da molécula LCPSP3027 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 56: Representação do modo de interação da molécula LCPVL898 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 57: Representação do modo de interação da molécula LCPVL161 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 58: Representação do modo de interação da molécula LCPVL900 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho são distintos entre todas as DHODHs, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 59: Representação do modo de interação da molécula LCPVL682 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 60: Representação do modo de interação da molécula LCPVL604 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

Figura 61: Representação do modo de interação da molécula LCPVL480 com o sítio S1-S2 preditos pela estratégia III de docagem. Traços verdes correspondem a contatos hidrofóbicos. Os resíduos indicados em verde são conservados entre as enzimas TcDHODH, LmDHODH e HsDHODH, em vermelho os resíduos completamente distintos entre as DHODHs, e em amarelo são conservados nas enzimas de tripanossomatídeos e distintos na enzima humana. Figuras construídas nos programas Chimera e PoseView.

4.2.2. VARREDURA EM BIBLIOTECA DE COMPOSTOS POR TERMOFLUOR

Dos 1012 compostos testados, três moléculas (SNQ, SNU e UNK) induziram um aumento na temperatura de desnaturação de ambas as proteínas. Um ΔT_m maior que 2 °C foi o limite utilizado nesse trabalho para a identificação de candidatos a ligantes. Os gráficos de desnaturação térmica das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença destes ligantes, onde o sinal de fluorescência do corante SYPRO® orange foi monitorado em função da temperatura, estão mostrados na **Figura 62**. Além do deslocamento do pico de fluorescência, foi também observada uma diminuição gradual da intensidade de fluorescência, provavelmente devida à precipitação e agregação das proteínas desnaturadas.

Figura 62: Medidas da intensidade de fluorescência normalizadas em função da temperatura. As curvas de desnaturação térmica das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença de SNU (curva amarela), UNK (curva verde) e SNQ (curva vermelha) mostram uma estabilização significativa das enzimas quando comparadas com a curva controle, na ausência de ligantes (em azul).

O ponto de inflexão da curva obtida definido como T_m (temperatura de desnaturação), foi calculado para cada composto. O valor de T_m para TcDHODH-Y e LmDHODH na presença dos compostos SNU, UNK e SNQ estão compilados na **Tabela 9**. Como podemos notar, a variação na estabilidade térmica para ambas TcDHODH e LmDHODH foram bastante similares. Este fato sugeriu uma certa similaridade em relação ao mecanismo de ação destes compostos para as duas enzimas, nos fazendo levantar a hipótese que todos os compostos interagem no mesmo sítio de ambas as enzimas. De acordo com a **Tabela 9** os compostos SNQ e UNK foram responsáveis pela maior e menor variação, respectivamente, na temperatura de desnaturação (ΔT_m) da enzima DHODH de *L. major* e *T. cruzi*. As diferenças sutis identificadas nos valores de ΔT_m na presença destes compostos provavelmente podem ser associados à mudança de grupos substituintes no anel benzênico dos compostos SNQ, SNU e UNK. Além disso, os resultados demonstraram que os compostos são capazes de promover uma estabilização sutilmente maior na enzima LmDHODH, uma vez que para todos os compostos o

valor de ΔT_m foi ligeiramente maior nos ensaios realizados com a enzima LmDHODH.

Tabela 9: Valores determinados da temperatura de desnaturação térmica das enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y na presença dos ligantes SNQ, SNU e UNK, estão sendo apresentados na coluna T_m . Os valores na variação da temperatura de desnaturação térmica das enzimas testadas na presença dos ligantes estão sendo apresentados na coluna ΔT_m

Amostra	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
TcDHODH	59.92	-
TcDHODH-SNQ	62.82	2.90
TcDHODH-SNU	62.09	2,17
TcDHODH-UNK	61.76	1.84
LmDHODH	51.21	-
LmDHODH-SNQ	55.23	4,02
LmDHODH-SNU	55.06	3,85
LmDHODH-UNK	54.50	3,29

4.2.3. VARREDURA *IN VITRO* POR ENSAIO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Ao longo do desenvolvimento deste projeto, vários compostos de origem natural e sintética foram testados quanto ao seu potencial inibitório com relação às enzimas LmDHODH e TcDHODH. A grande maioria dos compostos testados não apresentaram efeitos significativos sobre as enzimas a ponto de ter seu mecanismo de ação explorados. As moléculas cujos ensaios espectrofotométricos as identificaram como potenciais inibidores foram submetidas a ensaios mais detalhados quanto a avaliação do seu potencial inibitório e a mecanismo de ação.

Em particular, através da colaboração com o Prof. Dr. Flávio da Silva Emery da FCFRP – USP, vários compostos, cuja atividade leishmanicida havia sido previamente caracterizada (dados não publicados) foram testados contra as enzimas LmDHODH e TcDHODH. Três compostos naftotiazólicos (QXOLT, QXOLMT, QXOLA2) (**Figura 63**) foram testados e identificados como inibidores irreversíveis das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH, pois são responsáveis pelo cessamento

completo da formação de orotato alguns segundos após o início da reação (**Figura 64**). Vale ressaltar, que os experimentos de inibição enzimática foram realizados na presença de detergente (Triton X-100) evitando, desta forma, a identificação de inibidores falso-positivo por uma possível agregação dos compostos, uma vez que estas moléculas apresentam anéis fundidos e partes apolares que possuem elevado potencial de agregação.

Figura 63: Estrutura química dos compostos que apresentam atividade anti-leishmania (a) QXOLT, (b) QXOLMT e (c) QXOLA2.

Figura 64: Gráficos do monitoramento da formação de orotato em função do tempo. Medidas de formação de orotato para as enzimas (a) LmDHODH e (b) TcDHODH, na ausência de ligantes (em preto), e na presença dos inibidores qxolt (vermelho), qxolmt (azul) e qxola2 (verde). O perfil das curvas demonstram a inibição das enzimas na presença dos compostos devida a taxas baixíssimas de formação do orotato, quando comparada com a curva referência.

Além da determinação da constante de inibição, estes compostos foram selecionados para a realização dos ensaios de caracterização estrutural enzima-inibidor. Como veremos em detalhes na próxima seção, a determinação da estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH em complexo com estes compostos, permitiu

observarmos que os compostos testados estavam sendo clivados pela enzima LmDHODH e identificamos a região de interação destas moléculas, que envolviam a ligação covalente com a cisteína catalítica (Cys131) e a cisteína (Cys 150) localizada no bolsão S2.

Com base nestes resultados, decidimos por testar fragmentos menores, que continham propriedades químicas semelhantes aos derivados de tiazóis previamente identificados (**Figura 65**). Nossa hipótese era testar fragmentos estruturalmente e eletronicamente semelhantes aos compostos testados e aos seus derivados oxidados. Estas moléculas, além de validar novas regiões como sítios para o planejamento de ligantes, também tinham como meta nos auxiliar a compreender o mecanismo de ataque da enzima e de inibição dos compostos tiazólicos.

Figura 65: Estrutura química dos compostos (a) 2-aminotiazol, (b) Isotiocianato de metila, (c) Fenil isotiocianato, (d) 4-Nitrofenil isotiocianato.

4.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO

4.3.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS PELA VARREDURA *IN SILICO* EM BIBLIOTECA DE COMPOSTOS

As moléculas identificadas como potenciais ligantes das enzimas LmDHODH e TcDHODH através da varredura *in silico* foram submetidas aos ensaios espectrofotométricos para avaliação do seu potencial inibitório (**Tabela 10** e **Tabela 11**). Além disso, foram também realizados testes de validação cruzada, avaliando-se o potencial inibitório dos mesmos compostos contra a enzima HsDHODH (**Tabelas 10** e **11**).

Tabela 10: Porcentagem de inibição dos compostos da primeira geração identificados através da varredura virtual de ligantes em biblioteca de compostos, docados contra a enzima TcDHODH-Y. Nesta tabela encontra-se listado a identificação de cada composto, a empresa representante e as porcentagens de inibição que os respectivos compostos causaram nas enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 11 μ M do composto teste. As moléculas onde a inibição foi considerada significativa estão identificadas em amarelo

Molécula	Empresa	Sítio	% Inibição		
			TcDHODH-Y	LmDHODH	HsDHODH
LCPEN355	ENAMINE	S3-S4	46 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3	0
LCPEN484	ENAMINE	S3-S4	0	0	5 $\pm$ 2
LCPSP726	SPECS	S3-S4	0	0	18 $\pm$ 1
LCPEN048	ENAMINE	S3-S4	0	0	5 $\pm$ 2
LCPEN054	ENAMINE	S3-S4	0	0	0
LCPEN352	ENAMINE	S3-S4	0	0	0
LCPSA407	SIGMA	S1	0	0	0
LCPSA460	SIGMA	S1	0	0	0
LCPEN889	ENAMINE	S1	0	0	0

Tabela 11: Porcentagem de inibição dos compostos da segunda geração identificados através da varredura virtual de ligantes em biblioteca de compostos, docados contra a enzima LmDHODH. Nesta tabela encontra-se listado a identificação de cada composto, a empresa representante e as porcentagens de inibição que os respectivos compostos causaram nas enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 11 μ M do composto teste. As moléculas onde a inibição foi considerada significativa estão identificadas em amarelo

Molécula	Empresa	Sítio	% Inibição		
			TcDHODH-Y	LmDHODH	HsDHODH
LCPVL480	VITAS LAB	S1	0	0	0
LCPVL604	VITAS LAB	S1	0	0	0
LCPVL682	VITAS LAB	S1	0	0	0
LCPVL900	VITAS LAB	S1	8 $\pm$ 4	9 $\pm$ 3	13 $\pm$ 2
LCPVL161	VITAS LAB	S1	0	0	0
LCPVL898	VITAS LAB	S1	100,8 $\pm$ 0,2	101,8 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 2
LCPSP3027	SPECS	S1	94,2 $\pm$ 0,3	94,1 $\pm$ 0,2	0

De acordo com os resultados apresentados anteriormente, os compostos LCPEN355, LCPVL898 e LCPSP3027 foram identificados como inibidores das enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y. Nenhum destes compostos apresentou atividade inibitória em relação à enzima humana, comprovando o sucesso na busca de seletividade dos compostos docados. Para avaliarmos a concentração de composto responsável pela inibição de 50 % da atividade enzimática (IC_{50}), realizamos novos experimentos, onde a concentração no inibidor foi variada. Os gráficos obtidos estão representados na **Figura 66** e os valores de IC_{50} obtidos estão sumarizados na **Tabela 12**. De acordo com a **Tabela 12**, as moléculas LCPSP3027 e LCPVL898, ambas planejadas para o sítio ativo (S1), foram as mais potentes, com valores de IC_{50} para ambas as enzimas na mesma ordem de grandeza, em torno de 1,6 μ M. Já a molécula LCPEN355, planejada para o sítio S3-S4 foi menos potente, com valores de IC_{50} em torno de 30 μ M para ambas as enzimas, TcDHODH-Y e LmDHODH.

Estes resultados se mostraram bastante promissores, o que nos levou a investigarmos o mecanismo de inibição, através da determinação da estrutura cristalográfica, assim como realizar estudos de inibição da proliferação celular em cultura de células de *Leishmania*.

Figura 66: Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC₅₀, para os experimentos realizados com as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH.

Tabela 12: Valores de IC_{50} , em μM , calculados para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença dos compostos testados

Molécula	IC_{50} (μM)	
	TcDHODH-Y	LmDHODH
LCPSP3027	$1,65 \pm 0,03$	$1,66 \pm 0,03$
LCPVL898	$5,02 \pm 0,01$	$2,82 \pm 0,02$
LCPEN355	$28,18 \pm 0,04$	$30,15 \pm 0,02$

4.3.2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DAS MOLÉCULAS IDENTIFICADAS PELA VARREDURA EM BIBLIOTECA DE COMPOSTOS POR TERMOFLUOR

Os compostos que foram identificados pela técnica Termofluor e que atribuíram uma maior estabilidade às enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH, também foram submetidos aos ensaios de inibição enzimática. Mesmo utilizando altíssimas concentrações dos ligantes, 500 μM , nos ensaios de inibição, não observamos nenhuma alteração na atividade enzimática das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH, como pode ser observado na **Tabela 13**.

Tabela 13: Lista das moléculas identificadas através da varredura de ligantes em biblioteca de compostos por Termofluor. Nesta tabela encontra-se listado a identificação de cada composto, a empresa representante e as porcentagens de inibição que os respectivos compostos causaram nas enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 500 μM do composto teste

Molécula	Empresa	% Inibição		
		TcDHODH-Y	LmDHODH	HsDHODH
SNQ	Maybridge	6 ± 3	0	0
SNU	Maybridge	0	0	0
UNK	Maybridge	0	0	0

4.3.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL INIBITÓRIO DAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA PREVIAMENTE AVALIADA

Os ensaios preliminares de inibição enzimática realizados na presença dos naftotiazólicos (QXOLT, QXOLMT e QXOLA2) cedidas pelo Prof. Dr. Flávio da Silva Emery da FCFRP – USP, e cuja atividade antileishmania já tinha sido avaliada e comprovada, indicaram que as enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y eram inibidas

de forma irreversível por estes compostos (**Tabela 14**). Além disso, os estudos de validação cruzada realizados contra a enzima humana também comprovaram a seletividade destes compostos para as enzimas dos tripanosomatídeos.

Tabela 14: Lista dos compostos com atividade anti-leishmania já comprovado, testados contra as enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH. A tabela apresenta as porcentagens de inibição determinadas, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 11 μ M do composto teste. Estão selecionados em amarelo os casos onde ocorreram inibições significativas

Molécula	% Inibição		
	TcDHODH-Y	LmDHODH	HsDHODH
QXOLT	100,4 $\pm$ 0,3	102,2 $\pm$ 0,3	0
QXOLMT	101,4 $\pm$ 0,3	101,5 $\pm$ 0,4	8 $\pm$ 2
QXOLA2	101,4 $\pm$ 0,3	101,1 $\pm$ 0,3	3 $\pm$ 2

Para avaliarmos a concentração de composto responsável pela inibição de 50 % da atividade enzimática (IC_{50}), realizamos novos experimentos, onde a concentração no inibidor foi variada (**Figura 67**) e os valores de IC_{50} obtidos estão sumarizados na **Tabela 15**. Como podemos observar, as moléculas identificadas se mostraram seletivas e potentes contra as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH. A molécula mais potente identifica é o naftotiazol QXOLA2, para o qual para a concentração de 200 nM já se observa a inibição de 50 % da atividade de ambas as enzimas testadas .

Figura 67: Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC₅₀, para os experimentos realizados com as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH.

Tabela 15: Valores de IC₅₀, em μM, calculados para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença dos compostos testados

Molécula	IC ₅₀ (μM)	
	TcDHODH-Y	LmDHODH
QXOLT	1,16 ± 0,03	1,06 ± 0,01
QXOLMT	1,13 ± 0,02	1,33 ± 0,01
QXOLA2	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,03

Os ensaios de inibição enzimática também foram realizados com as moléculas, 2-aminotiazol, Isotiocianato de metila, Fenil isotiocianato e 4-Nitrofenil isotiocianato, no intuito de identificarmos alguma atividade destes fragmentos que poderiam nos guiar para a compreensão do mecanismo inibitório das moléculas QXOLT, QXOMT e QXOLA2 (**Tabela 16**). Além disso, para avaliar a seletividade na inibição provocada por estas moléculas, foram realizados ensaios de validação cruzada contra a enzima humana (**Tabela 16**).

Tabela 16: Lista das pequenas moléculas testadas contra as enzimas TcDHODH-Y, LmDHODH e HsDHODH. A tabela apresenta as porcentagens de inibição determinadas, quando os ensaios foram realizados utilizando-se concentração máxima de 110 μM do composto teste. Estão selecionados em amarelo os casos onde ocorreram inibições significativas

Molécula	% Inibição		
	TcDHODH-Y	LmDHODH	HsDHODH
2-Aminotiazol	0	0	*
Isotiocianato de metila	8 ± 2	5 ± 2	*
Fenil isotiocianato	79 ± 1	24 ± 2	0
4-Nitrofenil isotiocianato	97 ± 1	94 ± 2	0

* compostos não foram testados

De acordo com os resultados obtidos, os compostos Fenil isotiocianato e 4-Nitrofenil isotiocianato inibiram ambas as enzimas DHODH de tripanossomatídeos. Além disso, nenhum destes dois compostos inibiu a enzima humana. Para avaliarmos a concentração de composto responsável pela inibição de 50 % da atividade enzimática (IC_{50}), realizamos novos experimentos, onde a concentração no inibidor foi variada. Para o composto Fenil isotiocianato não foi possível calcular o valor de IC_{50} em relação à enzima LmDHODH, uma vez que este apresenta baixa capacidade inibitória. Além disso, o aumento da concentração do composto causava precipitação do mesmo, impedindo a obtenção do resultado esperado. Os gráficos obtidos estão sendo representados na **Figura 68** e os valores de IC_{50} obtidos estão sumarizados na **Tabela 17**.

Figura 68: Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC₅₀, para os experimentos realizados com as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH.

Tabela 17: Valores de IC₅₀, em μM, calculados para as enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH na presença dos compostos testados

Molécula	IC ₅₀ (μM)	
	TcDHODH-Y	LmDHODH
Fenil isotiocianato	60,38 ± 0,03	-
4-Nitrofenil isotiocianato	28,58 ± 0,01	27,78 ± 0,04

Estes resultados demonstram que apesar de menos potentes, estas pequenas moléculas também atuam como inibidoras, como os compostos da série QXO. Indicando, desta forma, que os grupamentos químicos presentes nestas moléculas e também nos compostos da série QXO podem ter um papel importante no mecanismo de inibição das enzimas de tripanossomatídeos. O mecanismo de ação destes compostos foi avaliado através da determinação da estrutura cristalográfica dos compostos obtidos.

4.4. ESTUDOS ESTRUTURAIS DAS DHODHs POR CRISTALOGRAFIA

4.4.1. TcDHODH-Y-His

A determinação da estrutura cristalográfica da enzima TcDHODH-Y foi tema do projeto de mestrado deste mesmo autor. No entanto, os cristais obtidos eram geminados e existia uma grande dificuldade na reprodutibilidade dos experimentos. Durante o projeto de doutorado, foram dedicados grandes esforços para otimizar as condições de cristalização da enzima, através da realização de novos ensaios de cristalização, e mudanças no protocolo de purificação, sem que nenhuma nova condição de cristalização promissora para a enzima TcDHODH-Y-SHis pudesse ser identificada. Logo após a publicação do nosso artigo, descrevendo a estrutura cristalográfica da TcDHODH-Y (PINHEIRO; IULEK; NONATO, 2008), foi publicado na literatura a estrutura cristalográfica da enzima DHODH de *Trypanosoma cruzi* da cepa Tulahuen (gene 2), TcDHODH-T2, onde condições bastante distintas de cristalização foram descritas (INAOKA et al., 2005). Embora, as enzimas de DHODH de *T. cruzi* compartilhem mais que 99% de identidade sequencial (uma única mutação) as novas condições de cristalização foram testadas sem sucesso. Estes resultados nos levou a questionar quais diferenças existentes entre a amostra produzida por (INAOKA et al., 2005) e a produzida em nosso laboratório poderia ser responsável pelo insucesso nos experimentos de cristalização. Nesta oportunidade, duas diferenças importantes foram identificadas. A primeira consistia na presença da cauda de histidina presente na nossa amostra e ausente na amostra da TcDHODH-T2. Outra diferença corresponde ao resíduo de fenilalanina (Phe63), localização da única mutação observada entre as estruturas e onde na enzima TcDHODH-Y observa-se um resíduo de valina. A análise de estrutura cristalográfica da TcDHODH-T2 (PDB código 2DJX) mostra que este resíduo se encontra na superfície da proteína e se encontra envolvido em interações cristalinas. Na tentativa de avaliar a relevância de cada uma destas características, inicialmente uma nova construção foi desenvolvida neste projeto (conforme mostrado a seguir) onde a cauda de histidina foi removida e os ensaios de cristalização foram repetidos. Além disso, no momento, experimentos de mutação sítio-dirigida estão sendo realizados em nosso laboratório de forma a testar o papel da Phe63 para o sucesso da cristalização.

4.4.2. TcDHODH-Y

Amostras de proteína provenientes da nova construção, onde a cauda de histidina foi removida, foram submetidas a inúmeros ensaios de cristalização. Conforme observado nos experimentos de purificação, onde a cromatografia por interação hidrofóbica foi incorporada, duas diferentes populações da enzima puderam ser identificadas. Como já possuíamos uma condição de cristalização determinada para a enzima TcDHODH-Y, decidimos verificar se com a separação das populações obteríamos cristais de maior qualidade. Desta forma, realizamos uma varredura com as condições de cristalização já conhecidas, utilizando ambas as populações da enzima TcDHODH-Y de forma independente. Com a proteína sem atividade (segunda fração) não obtivemos a formação de nenhum cristal. No entanto, os ensaios de cristalização realizados com a enzima com atividade (primeira fração) foram realizados com sucesso. Diferentemente dos ensaios que eram realizados com a mistura das populações, desta vez conseguimos ter uma maior reprodutibilidade na formação dos cristais. Os melhores cristais (**Figura 69**) foram obtidos exatamente nas mesmas condições que foram otimizadas quando a proteína era purificada somente através da cromatografia por afinidade. Estes cristais cresceram a 25 °C na presença de 5 % de isopropanol, 1,5 M sulfato de amônio, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0 e 2,0 mM de DTT. Infelizmente, apesar do aumento na reprodutibilidade na obtenção destes cristais, a mesma desordem cristalina foi identificada através dos experimentos de difração de raios-X, onde o padrão de difração era caracterizado por alta anisotropia e “spots” difusos (resultados não apresentados).

Estes resultados nos levaram a buscar por novas condições de cristalização para as duas populações separadas. Nestes experimentos, realizados com os kits de cristalização Crystal ScreenTM e Crystal Screen 2TM (Hampton Research) e PEG/Ion ScreenTM (Hampton Research), somente para as amostras ativas provenientes da 1^o fração, foi possível identificar uma condição de cristalização promissora. No entanto, verificamos a formação de cristais apenas na condição de cristalização já conhecida (condição 5 do Crystal Screen 2TM - 5% v/v isopropanol, 2,0 M sulfato de amônio).

Figura 69: Cristais da enzima TcDHODH-Y (13 mg/mL) obtido na condição (1,5 M sulfato de amônio, 5 % v/v isopropanol, 0,1 M acetato de sódio pH 5.0, 2 mM DTT) e volume da gota 2 μ L : 2 μ L (solução de proteína : solução de cristalização). Dimensão aproximada de 0.4 mm ao longo do eixo maior, estimada com o *loop* de coleta.

4.4.2.1. **Cristalização robotizada da fração I da enzima TcDHODH-Y**

Outra tentativa de identificarmos uma nova condição de cristalização foi a de utilizarmos experimentos de cristalização em robô e onde novos kits de cristalização foram testados: AmSO₄ Suite 8x12 (Qiagen). ; PEGs Suite 8x12; MPD Suite 8x12; JCSG+ Suite 8x12; Classic Suite 8x12 e PGA Screen 8x12. Dentre as 576 diferentes condições testadas na busca robotizada, apenas três diferentes condições foram identificadas como promissoras para cristalização para a enzima TcDHODH-Y. Os micro cristais foram obtidos somente nos ensaios de cristalização realizados com a enzima a 10 mg/mL em tampão 50 mM Hepes ajustado em pH 7,2 e 150 mM NaCl. Estes cristais cresceram a 22 °C na presença de 2,2 M de sulfato de amônio como agente precipitante. Cada uma das três condições identificadas possuíam diferentes aditivos, como segue: 0,2 M sulfato de potássio; 0,2 M nitrato de sódio e 0,2 M brometo de sódio (**Figura 70**).

Figura 70: Cristais da enzima TcDHODH-Y (10 mg/mL) obtidos nas condições: **(a)** 2,2 M sulfato de amônio e 0,2 M sulfato de potássio; **(b)** 2,2 M sulfato de amônio e 0,2 M nitrato de sódio e **(c)** 2,2 M sulfato de amônio e 0,2 M brometo de sódio.

Apesar do crescimento dos micro-cristais na busca robotizada, não foi possível reproduzir os resultados através de ensaios de cristalização manuais.

4.4.3. LMDHODH

Devido à grande dificuldade na obtenção de cristais de qualidade para a enzima TcDHODH-Y e, por outro lado, a facilidade em cristalizar a enzima LmdHODH e a excelente qualidade dos cristais obtidos, optamos por utilizar a enzima LmdHODH como modelo para obtermos informações estruturais a cerca do mecanismo de inibição das moléculas bioativas em relação as DHODHs de tripanossomatídeos.

4.4.3.1. *Cristalização com compostos provenientes da varredura in silico*

4.4.3.1.1. *Moléculas da primeira geração*

Os compostos ácido 5-aminoorótico e ácido 5-nitroorótico, análogos do produto da catálise orotato e representados na **Figura 53** como composto 4 e 5, respectivamente, foram identificados como ligantes para o sítio ativo da enzima de TcDHODH pelo grupo NEQUIMED-PN do Instituto de Química de São Carlos - USP. Os valores de K_i posteriormente determinados por ITC foram de 95 ± 15 e 139 ± 26 para as moléculas ácido 5-aminoorótico e ácido 5-nitroorótico, respectivamente.

Para a comprovação do mecanismo de inibição destes compostos, a enzima LmDHODH foi cristalizada e, através de experimentos de "soaking" com os ligantes, a estrutura cristalográfica dos complexo foi determinada e refinada com boa geometria. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão compilados na **Tabela 18**. As estruturas cristalográficas de ambos os complexos foram depositadas no banco de dados Protein Data Bank (PDB) sob códigos de acesso 3MJY (LmDHODH – ácido 5-aminoorótico) e 3MHU (LmDHODH–ácido 5-nitroorótico).

Tabela 18 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,437$ Å), a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado

Dados e Parâmetros	LmDHODH Ácido 5-aminoorótico	LmDHODH Ácido 5-nitroorótico
Coleta de Dados		
Sistema Cristalino	Hexagonal	Hexagonal
Grupo espacial	P6 ₁	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=141,56, c=68,81	a=b=141,26, c=68,74
Intervalo de Resolução (Å)	35,14 – 1,85 (1,95 – 1,85)	35,31 – 1,96 (2,07 – 1,96)
Moléculas por unidade assimétrica	2	2
Completeza (%)	97,6 (98,8)	100 (100)
I / sigma(I)	14,9 (2,7)	14,3 (2,9)
^a R _{sym} (%)	8,5 (55,2)	11,8 (65,1)
Nº reflexões únicas	65.142 (9.593)	56.261 (8.154)
Multiplicidade	6,3 (6,0)	7,6 (7,4)
Refinamento da Estrutura		
Resolução (Å)	31,47 – 1,85	31,41 – 1,96
Fator de temperatura médio (Å ²)	20,69	20,56
^b R _{factor}	15,81	15,83
^c R _{free}	19,40	19,78
Ângulos de ligação – rmsd (°)	1,248	1,169
Comprimento de ligação – rmsd (Å)	0,013	0,008
Ramachandram		
Região mais favorável (%)	91,4	92,9
Região adicional permitida (%)	8,6	7,1

^a $R_{sym} = \sum |I_{obs} - \langle I \rangle| / \sum I_{obs}$ onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

^b $R_{factor} = \sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^c R_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

A inspeção visual do mapa de omissão permitiu a identificação dos ligantes no sítio ativo da enzima LmDHODH, que posteriormente foram modelados e apresentaram um excelente ajuste na densidade eletrônica (**Figura 71**). Durante a inspeção da estrutura cristalográfica dos complexos, verificamos que ambos compostos apresentam essencialmente as mesmas interações quando interagem no sítio catalítico (**Figura 71**). No entanto, foi possível observar que o composto ácido 5-aminoorótico promove uma interação com o resíduo Ser100 (equivalente a Ser99 da enzima TcDHODH-Y) mediada por uma molécula de água (**Figura 71**). Estes resultados nos levaram a questionar a possibilidade de planejarmos moléculas maiores baseada no composto ácido 5-aminoorótico, mas crescendo na direção da molécula de água. Outra observação importante é a presença do resíduo de serina (Ser100) conservado nas enzimas de tripanossomatídeos, o qual está interagindo com a molécula de água e que na enzima humana é substituído por um resíduo de glicina. O resíduo de glicina possui propriedades químicas e estéricas bastante distintas da serina e, assim, poderíamos, além do caráter inibitório destas moléculas, também explorar a seletividade dos ligantes frente às enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y.

Estes primeiros resultados, obtidos para a primeira geração de ligantes e que consistiam em moléculas análogas ao produto da catálise, orotato, com substituintes na posição do carbono C5 do orotato, nos forneceram a primeira evidência experimental de que inibidores seletivos poderiam ser desenhados de forma a tirar proveito de interações de hidrogênio entre os ligantes e a serina conservada em membros da classe 1A das DHODs. Estes resultados bastante promissores foram compilados na forma de um artigo científico e este publicado no *European Journal of Medicinal Chemistry* (CHELESKI et al., 2010).

Foi com a idéia de buscar novos compostos com grupos substituintes na posição C5 do orotato que iniciamos uma nova varredura *in silico* em biblioteca de compostos, a qual foi denominada Segunda Geração, utilizando como receptor a enzima LmDHODH que tinha sido determinada em complexo com os inibidores ácido 5-aminoorótico (PDB código 3MJY) e ácido 5-nitroorótico (PDB código 3MHU).

Figura 71: Interações entre o ácido (a) 5-Nitroorótico e (b) 5-Aminoorótico no sítio ativo da enzima LmDHODH. O mapa em azul representa o mapa de densidade eletrônica final 2Fo-Fc contornado a 1.0σ . Em verde está representado o ligante ácido 5-Nitroorótico e em rosa o ligante ácido 5-Aminoorótico. Em cinza estão representados os resíduos que compõem o sítio ativo da enzima e que estão interagindo com os ligantes. O único resíduo que difere na interação entre ambos os compostos está indicado em amarelo, sendo que este interage com o ligante através mediado por uma molécula de água, que interage como grupo amino da posição 5 do anel pirimidínico. Figura gerada no programa Pymol.

4.4.3.1.2. Moléculas da segunda geração

Os compostos LCPSP3027 e LCPVL898, denominados de ligantes da segunda geração foram inicialmente identificados por varredura *in silico* como inibidores das enzimas TcDHODH-Y e LmDHODH, e tiveram seu potencial inibitório avaliado em nossos ensaios de atividade (apresentados na seção 4.3.1.) Como próxima etapa, iniciamos os estudos do mecanismo de inibição a partir da determinação da estrutura cristalográfica dos complexos LmDHODH-LCPSP3027 e LmDHODH-LCPVL898 através da utilização de técnicas de co-cristalização. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão resumidas na **Tabela 19**.

Tabela 19 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,608 \text{ \AA}$), a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado

Dados e Parâmetros	LmDHODH LCPVL898	LmDHODH LCPSP3027
Coleta de Dados		
Sistema Cristalino	Hexagonal	Hexagonal
Grupo espacial	P6 ₁	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=144,16, c=69,98	a=b=144,56, c=69,74
Intervalo de Resolução (Å)	47,19 – 2,23 (2,36 – 2,23)	50,19 – 2,40 (2,52 – 2,40)
Moléculas por unidade assimétrica	2	2
Completeza (%)	99,3 (95,3)	98,0 (86,6)
I / sigma(I)	7,7 (2,3)	6,9 (2,3)
^a R _{sym} (%)	27,6 (64,7)	23,7 (60,9)
Nº reflexões únicas	40.066 (5.570)	32.242 (4.0957)
Multiplicidade	6,9 (6,1)	5,8 (4,9)
Refinamento parcial da Estrutura		
Resolução (Å)	47,19 – 2,24	47,32 – 2,41
Fator de temperatura médio (Å ²)	13,65	18,68
^b R _{factor}	22,98	21,65
^c R _{free}	27,38	26,34
Ângulos de ligação – rmsd (°)	1,7409	1,7865
Comprimento de ligação – rmsd (Å)	0,018	0,019

^a $R_{sym} = \sum |I_{obs} - \langle I \rangle| / \sum I_{obs}$ onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

^b $R_{factor} = \sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^c R_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

Infelizmente, mesmo depois de uma inspeção criteriosa no mapa de densidade eletrônica, não foi possível identificarmos a presença dos ligantes na estrutura da enzima, nem no sítio ativo, nem em qualquer outra região da estrutura. Questionamos inicialmente a possibilidade de uma dificuldade de incorporação do ligante na proteína. No entanto, os ensaios de atividade realizados com as amostras pré-incubadas com os ligantes e utilizadas nos experimentos de cristalização, comprovaram que a enzima LmDHODH, na presença de ambos compostos, se encontrava completamente inativa, enquanto, a falta de atividade observada para a enzima poderia ser consequência da perda da estrutura da proteína, o que não era o caso, uma vez que as amostras eram cristalizáveis e as estruturas cristalográficas indicavam nitidamente a integridade estrutural da amostra, ou que a ausência de atividade era consequência da inativação da enzima pelos ligantes.

Vários experimentos foram realizados para avaliarmos nossa hipótese. No primeiro avaliamos o caráter inibitório das moléculas. Neste ensaios, a proteína foi incubada com os compostos LCPSP3027 e LCPVL898 por 24 horas, seguida de ensaio de atividade onde verificamos a inativação da enzima. Em seguida, após uma diálise da enzima inativa, seguida de novos ensaios de atividade enzimática, comprovaram que a enzima não retomava sua atividade, sugerindo que estes compostos estariam interagindo covalentemente com nossa enzima.

Assim, para testar a hipótese que a proteína depois de incubada com os ligantes, poderia adotar o perfil de um inibidor irreversível, realizamos um ensaio de inibição tempo dependente (**Tabela 20**). É sabido que inibidores irreversíveis geralmente são dependentes tanto da concentração utilizada nos ensaios cinéticos como também o tempo de incubação (KRIPPENDORFF et al., 2009) e que, portanto, se caso as moléculas LCPSP3027 e LCPVL898 apresentassem mesmo um caráter de inibidor irreversível, este perfil só poderia ser visualizado para tempos maiores de incubação.

Tabela 20: Ensaio de inibição enzimática em função do tempo para os compostos LCPSP3027 e LCPVL898 contra a enzima LmDHODH, mantendo-se fixa a concentração do inibidor igual a 11 μM . Em amarelo está selecionado o momento em que a porcentagem de inibição ultrapassa de 90%

Tempo (min)	% Inibição	
	LCPVL898	LCPSP3027
0	24 $\pm$ 4	9 $\pm$ 4
30	72 $\pm$ 1	13 $\pm$ 4
60	93 $\pm$ 1	24 $\pm$ 3
120	101 $\pm$ 1	45 $\pm$ 2
180	107 $\pm$ 1	57 $\pm$ 2
1440	101 $\pm$ 1	93 $\pm$ 2

Como observado na **Tabela 20**, a capacidade inibitória dos compostos LCPSP3027 e LCPVL898 varia com o tempo, desde valores baixos para as medidas realizadas no tempo zero, isto é, sem incubação, até chegar a completa inativação da enzima para tempos maiores de incubação. Considerando o tempo de incubação da enzima na presença dos compostos (24h), previamente aos estudos de cristalização, podemos concluir que a amostra no momento da preparação das caixinhas de cristalização se encontra inativa, como anteriormente observado.

Considerando então a hipótese de que os compostos LCPSP3027 e LCPVL898 inibem irreversivelmente a enzima, principalmente nas condições de cristalização utilizadas, passamos a analisar as estruturas cristalográficas sob outra perspectiva. Agora não somente buscávamos densidade eletrônica correspondente a esses ligantes, como também alterações na estrutura que pudessem ser causadas pelos ligantes e que justificassem o caráter irreversível da inibição.

Neste busca, nenhuma variação significativa com relação à proteína nativa pode ser observada. O único fato digno de nota corresponde a alça catalítica que se encontrava flexível e desordenada e não pode ser refinada. (**Figura 72**).

Figura 72: Representação em "cartoon" da região do sítio ativo das estruturas cristalográficas dos complexos LmDHODH-LCPVL898 (estrutura representada em verde) e LmDHODH-LCPSP3027 (estrutura representada em rosa), e da estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH (representada em cinza) onde a alça catalítica (representada em vermelho) se encontra ordenada (PDB código 3TQ0). A inspeção dos mapas de densidade eletrônica para os complexos LmDHODH-LCPVL898 e LmDHODH-LCPSP3027 indicam que os resíduos Ser100 e Gln139, representados em azul, são os últimos resíduos ordenados que antes e após, respectivamente, a alça catalítica. A molécula de FMN está representada em amarelo. Figura gerada no programa Pymol.

Combinando os resultados obtidos até o presente momento, associados com o fato de que as moléculas LCPSP3027 e LCPVL898 haviam sido docadas para interagir no sítio S1, levantamos a possibilidade de que o comportamento irreversível destes ligantes estava associado a alguma alteração na alça catalítica e que não era visualizada devido a sua flexibilidade. Além disso, é importante aqui lembrar que a idéia do planejamento de moléculas da segunda geração se baseava na busca de moléculas análogas ao substrato, mas acrescidos de grupos

químicos a partir da posição C5 do orotato (**Figura 42**), exatamente a posição do substrato que sofre o ataque pela cisteína catalítica (Cys131 em LmDHODH e cys130 em TcDHODH), que é localizada na alça catalítica.

Acreditamos, assim, na hipótese de que estes ligantes, da mesma forma que o substrato natural, poderiam sofrer o ataque pela cisteína catalítica, no entanto, neste caso, se mantendo covalentemente ligado a alça catalítica.

Diante da impossibilidade de mapearmos o mecanismo de inibição, decidimos por enviar estes compostos para ter sua atividade leishmanicida e citotoxicidade *in vitro* testadas. Nos ensaios anti-promastigotas, utilizando *Leishmania braziliensis*, foi determinado os valores de DL₅₀ de 2,8 µM e 2,1 µM para os compostos LCPVL898 e LCPSP3027, respectivamente. Nos ensaios de citotoxicidade em células de mamíferos (em macrófagos) foi verificado que estas moléculas não causaram danos às células. A avaliação da ação dessas moléculas na forma amastigota do parasito demonstraram a atividade dos compostos contra essa forma infectante do parasito. Estes experimentos foram realizados pela Dra. Camila Figueiredo Pinzan da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, através da colaboração com a Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz.

Os resultados obtidos sugerem que os compostos LCPSP3027 e LCPVL898 inibem a enzima LmDHODH através de um mecanismo de inibição irreversível e dado seu potencial leishmanicida, nos leva a dar uma atenção especial para a utilização de moléculas análogas do orotato, garantindo assim não somente as interações com o resíduos do sítio ativo, como também sugerindo que o aumento da molécula na direção do C5 do orotato pode ser uma excelente estratégia para o planejamento de uma nova classe de ligantes seletivos para as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos.

4.4.3.2. Cristalização com compostos identificados por Termofluor

A determinação das estruturas cristalográficas da enzima LmDHODH complexada com os ligantes SNQ e SNU nos permitiram compreender o mecanismo de interação dos ligantes com a enzima LmDHODH de forma a justificar o aumento da estabilidade térmica das proteínas na presença dos mesmos. As estruturas cristalográficas da enzima LmDHODH em complexo com estes compostos foi

determinada e refinada com boa geometria. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão resumidos na **Tabela 21**.

Tabela 21 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,427 \text{ \AA}$), a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado

Dados e Parâmetros	LmDHODH SNQ	LmDHODH SNU
Coleta de Dados		
Sistema Cristalino	Hexagonal	Hexagonal
Grupo espacial	P6 ₁	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=143,07, c=69,00	a=b=142,20, c=68,74
Intervalo de Resolução (Å)	35,77 – 2,15 (2,27 – 2,15)	35,77 – 1,80 (1,90 – 1,80)
Moléculas por unidade assimétrica	2	2
Completeza (%)	97,8 (98,1)	100 (100)
I / sigma(I)	11,9 (2,6)	14,8 (2,5)
^a R _{sym} (%)	13,7 (80,3)	8,5 (70,4)
Nº reflexões únicas	43.015 (6.253)	73.441 (10.637)
Multiplicidade	7,0 (6,7)	6,4 (6,0)
Refinamento da Estrutura		
Resolução (Å)	35,77 – 2,15	35,24 – 1,80
Fator de temperatura médio (Å ²)	24,60	19,96
^b R _{factor}	18,06	19,96
^c R _{free}	22,75	19,10
Ângulos de ligação – rmsd (°)	1,060	1,124
Comprimento de ligação – rmsd (Å)	0,007	0,009
Ramachandram		
Região mais favorável (%)	92,7	91,0
Região adicional permitida (%)	7,3	9,0

^a $R_{sym} = \sum |I_{obs} - \langle I \rangle| / \sum I_{obs}$ onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

^b $R_{factor} = \sum_{hkl} ||F_{obs}| - |F_{calc}|| / \sum_{hkl} |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^c R_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

As estruturas cristalográficas de ambos os complexos foram depositadas no banco de dados Protein Data Bank (PDB) sob códigos de acesso 3SNQ (LmDHODH–SNQ) e 3SNU (LmDHODH–SNU).

Durante o refinamento inicial, a inspeção no mapa de densidade eletrônica de omissão (*omit map*) permitiu a identificação da posição dos compostos ligados à enzima LmDHODH (**Figura 73**). As coordenadas para cada ligante foram refinadas, e o excelente ajuste das moléculas na densidade eletrônica nos permitiu determinar a posição e conformação dos ligantes de forma inequívoca. (**Figura 73**).

Figura 73: Mapa de densidade eletrônica associado com os ligantes (A) SNU e (B) SNQ. Em verde está representado o mapa de omissão $F_o - F_c$ (*omit map*) contornado a 2.5σ . O mapa em azul representa o mapa de densidade eletrônica final $2F_o - F_c$ contornado a 1.5σ . Os ligantes estão coloridos de acordo com o tipo de átomo: carbono em cinza e nitrogênio em azul. Figura gerada no programa Pymol.

Os ligantes foram encontrados interagindo no sítio S5, cavidade situada na interface dimérica e ligam-se à enzima LmDHODH através de uma interação do tipo cátion- π e uma interação do tipo π -stacking. Interações do tipo cátion- π são consideradas um tipo de interação comum entre ligantes e proteína e tem sido reconhecida como uma importante interação não-covalente em biologia estrutural (GALLIVAN; DOUGHERTY, 1999).

A interação do grupo pirrol do ligante e a cadeia lateral aromática do resíduo Tyr142 de ambas as subunidades formam a interação do tipo π -stacking (**Figura 74**). Histidinas podem participar de interações do tipo cátion- π tanto como um cátion ou um sistema π , dependendo do seu estado de protonação. Sob as condições de cristalização da enzima LmDHODH, na qual consiste em pH 5,6 controlado por 100 mM de tampão cacodilato de sódio, os resíduos de histidina

estão protonados, permitindo sua participação como um cátion em interação do tipo cátion- π . Desta forma, a carga positiva do grupo imidazol da His174 é responsável pela interação com a face π do grupo benzeno dos compostos SNU e SNQ (**Figura 74**). O composto SNQ adota dupla conformação, que foram adequadamente refinadas com a mesma ocupação.

Figura 74: Representação do sítio de interação dos compostos SNQ e SNU. Para ambos os complexos a subunidade A e B estão representadas em rosa e azul, respectivamente. Os resíduos envolvidos na interação cátion- π e π -stacking estão representados na forma de "sticks". Os ligantes estão apresentados na forma de "ball-and-stick" em cinza. Duas orientações são mostradas para um melhor entendimento das interações entre os ligantes e a enzima LmDHODH. Figura gerada no programa Pymol.

Para uma melhor compreensão das mudanças estruturais causadas pela interação dos ligantes SNQ e SNU, as estruturas cristalográficas dos complexos foram comparadas com a estrutura da enzima LmDHODH nativa (PDB código 3GYE). A região flexível compreendendo os resíduos Ser130 a Tyr142, chamada de alça catalítica, é encontrada desordenada na estrutura da enzima nativa e em várias estruturas por nós determinada. Em contraste, em ambos os complexos, apenas o

intervalo de Cys131 a Lys137 se encontra desordenado. Uma análise mais detalhada identificou que a interação destes ligantes na enzima LmDHODH está intimamente relacionada com a manutenção ordenada dos resíduos da alça na estrutura. No complexo LmDHODH-SNU e LmDHODH-SNQ a cadeia lateral da His174 de ambas as subunidades adotaram uma nova conformação promovendo, desta forma, as interações do tipo cátion- π com os ligantes (**Figura 75**). A mudança da cadeia lateral da His174 é responsável pela perda da ligação de hidrogênio entre o átomo ND1 da His174 e o átomo OD do Asp171, que está presente na estrutura da enzima LmDHODH apo (**Figura 75**). Ao mesmo tempo, com a perda desta última interação, a cadeia lateral do Asp171 move-se em direção ao resíduo Gln139, resíduo este que já foi avaliado como situado num local estratégico da alça catalítica, atuando como uma "dobradiça" desta alça (NORAGER et al., 2003). Esta variação estrutural permite que o átomo OD2 do Asp171 forme uma ligação de hidrogênio com o átomo NE2 e NH do resíduo Gln139 da outra cadeia polipeptídica. A interação π -stacking entre os ligantes e a Tyr142 é responsável por estabilizar este resíduo, encontrado flexível na estrutura nativa. Os resíduos Tyr142 e Gln139 estão situados na base da alça e provavelmente estão envolvidos no controle do movimento desta alça. Interessantemente, os resíduos Tyr142, His174, Asp171 e Gln139 envolvidos nessa rede de interações são conservados entre todas as enzimas DHODHs pertencentes à classe 1A, e diferem na classe 2. Além disso, este sítio, situado na interface dimérica, não existe na classe 2 das DHODHs, mas é totalmente conservado nas enzimas da classe 1A das DHODHs.

Figura 75: Sobreposição estrutural da enzima LmDHODH nativa (representada em cinza) com os complexos LmDHODH-SNQ (amarelo) e LmDHODH-SNU (rosa). Os ligantes estão representados como "ball and stick". Em ambos os complexos a cadeia lateral da His174 movimenta-se e faz uma das interações cátion- π com os ligantes. Consequentemente, a ligação de hidrogênio entre a cadeia lateral da His174/A e a cadeia lateral do Asp171/A na estrutura nativa (linhas pontilhadas amarelas) é perdida. Ao mesmo tempo, a cadeia lateral do Asp171/A move-se e inicia a formação de duas ligações de hidrogênio com o resíduo Gln139/B do outro monômero (linhas pontilhadas vermelhas). Esta figura representa as interações que ocorrem em uma das subunidades para cada complexo. No entanto, o mesmo cenário é observado para a outra subunidade. Figura gerada no programa Pymol.

Os resultados obtidos nos fornecem evidências experimentais claras de que estes resíduos, e consequentemente, esse sítio, possuem um papel importante no controle e estabilização da alça catalítica nas enzimas da classe 1A das DHODHs.

Na verdade, experimentos de mutagênese sítio dirigida realizados em nosso grupo de pesquisa pela aluna Aline Luiz de Souza da FCFRP-USP (manuscrito em preparação), onde foram efetuadas as mutações Tyr142/Ala e His174/Ala, demonstram claramente o papel destes resíduos para a atividade catalítica da enzima LmDHODH. Através da determinação das constantes catalíticas, K_{cat} e K_m , em função de cada substrato natural, DHO e fumarato, foi possível observar uma redução significativa na eficiência catalítica da enzima para estes mutantes. Associados aos estudos cristalográficos que demonstraram claramente que as mutações não induziram nenhuma variação estrutural significativa, estes resultados reforçam a relevância deste sítio para o planejamento de ligantes.

A realização dos estudos de mutação sítio-dirigida também foi importante para sugerir que a interface dimérica tem uma correlação estrutural direta com a

segunda etapa da reação enzimática, onde o fumarato é utilizado como substrato para reciclar o FMN para novas etapas de catálise.

Considerando então que a interface dimérica tenha algum papel na estabilização ou caminho percorrido pelo fumarato, inibidores planejados para atuar nesta etapa da reação não poderão ser avaliados com o nosso ensaio enzimático/de inibição. Isto porque, neste experimento, o agente oxidante é substituído pela molécula de DCIP que recicla a enzima por um mecanismo supostamente distinto do substrato natural. Embora estes resultados não comprovem o caráter inibitório das moléculas identificadas como ligantes da interface dimérica, um novo ensaio de inibição precisará ser desenvolvido para efetivamente avaliarmos a correlação destas moléculas com a atividade enzimática e, portanto, validar o sítio S5 como uma cavidade relevante a ser explorada no planejamento de inibidores contra as enzimas da classe 1A.

Diante da limitação em avaliarmos algum efeito inibitório por essas moléculas utilizando nosso ensaio enzimático, decidimos por enviar o composto SNU para ter sua atividade leishmanicida e citotoxicidade *in vitro* testadas. Nos ensaios anti-promastigotas, utilizando *Leishmania braziliensis*, foi determinado o valor de DL₅₀ de 1,89 µM. Nos ensaios de citotoxicidade em células de mamíferos (em macrófagos) foi verificado que estas moléculas não causaram danos às células. A avaliação da ação desse composto na forma amastigota do parasito demonstrou a atividade desta molécula nesta forma infectante do parasito. Estes experimentos foram realizados pela Dra. Camila Figueiredo Pinzan da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, através da colaboração com a Profa. Dra. Angela Kaysel Cruz.

4.4.3.3. Cristalização na presença de compostos sintéticos

4.4.3.3.1. Compostos com atividade anti-leishmania

Na tentativa de identificar o sítio de interação destas moléculas, bem como compreender o mecanismo de inibição dos compostos QXOLT, QXOLMT e QXOLA2 frente as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, a enzima LmDHODH foi co-cristalizada com os ligantes QXOLT, QXOLMT e QXOLA2, e as estruturas determinadas por difração de raios-X. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão resumidos na **Tabela 22**.

Tabela 22 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,461$) para os complexos com QXOLT, QXOLMT a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX1. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado

Dados e Parâmetros	LmDHODH QXOLT	LmDHODH QXOLMT	LmDHODH QXOLA2
Coleta de Dados			
Sistema Cristalino	Hexagonal	Hexagonal	Hexagonal
Grupo espacial	P6 ₁	P6 ₁	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=138,82, c=68,20	a=b=142,45, c=68,98	a=b=142,22, c=69,092
Intervalo de Resolução (Å)	40,08 – 2,20 (2,32 – 2,20)	31,64 – 1,95 (2,06 – 1,95)	35,56 – 1,79 (1,88 – 1,79)
Moléculas por unidade assimétrica	2	2	2
Completeza (%)	100 (100)	98,7 (99,1)	100 (100)
I / sigma(I)	9,9 (2,5)	13,0 (2,7)	18,0 (2,5)
^a R _{sym} (%)	15,4 (69,3)	10,9 (89,46)	12,1 (77,2)
Nº reflexões únicas	38.204 (5.526)	57.534 (8.390)	75.405 (10.959)
Multiplicidade	6,0 (5,7)	7,1 (6,8)	21,3 (19,8)
Refinamento da Estrutura			
Resolução (Å)	34,71 – 2,20	34,49 – 1,95	21,23 – 1,79
Fator de temperatura médio (Å ²)	18,93	22,68	17,83
^b R _{factor}	21,45	20,98	21,01
^c R _{free}	24,59	24,71	24,48

^a $R_{sym} = \sum |I_{obs} - \langle I \rangle| / \sum I_{obs}$ onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

^b $R_{factor} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum |F_{obs}|$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^c R_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

Assim como para os compostos anteriormente descritos, a inspeção cuidadosa da densidade eletrônica não nos permitiu visualizar a densidade eletrônica que nos permitisse identificar a posição das moléculas na estrutura da enzima LmDHODH. Na verdade, uma observação importante foi a identificação da alça catalítica na posição aberta e estável de forma a permitir a modelagem de todos com resíduos da alça sem ambiguidade. Na verdade, durante o refinamento desta região é que pudemos perceber que a razão pela estabilização da alça catalítica nesta conformação se devia a presença de uma interação entre a Cys131, cisteína catalítica e a Cys150 (**Figura 76**). Nestas análises identificamos a presença de uma densidade eletrônica (**Figura 76**) entre os resíduos Cys131 e Cys150 em todos os complexos, que conectava as duas cisteínas e que embora não era compatível com

a densidade eletrônica esperada para os compostos testado, demonstravam claramente que a molécula ali ligada era responsável por diminuir drasticamente a mobilidade da alça catalítica mantendo-a na posição aberta. Algumas tentativas em se refinar pequenos fragmentos nesta região, como uma molécula contendo cinco átomos refinado na densidade eletrônica do complexo QXOLA2 (**Figura 77**), conjunto com maior resolução, sugeriram que o composto originalmente testado havia sido metabolizado pela enzima e fortaleceram a hipótese de que moléculas planejadas para interferir na mobilidade da alça catalítica poderiam ser utilizadas como potentes inibidores das enzimas DHODH de ambas as classes.

Figura 76: Representação de parte da estrutura cristalográfica da enzima LmDHODH complexada com os ligantes **(a)** QXOLT, **(b)** QXOLMT e **(c)** QXOLA2, juntamente com os mapas de densidade eletrônica. Em verde está representado o mapa de omissão Fo-Fc (omit map) contornado a 3.0σ . O mapa em azul representa o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ . Figura gerada no programa Pymol.

Figura 77: Em azul está representado o mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1σ , após o refinamento de um fragmento posicionado entre as cisteínas Cys131 e Cys150, no complexo LmDHODH-QXOLA2. Figura gerada no programa Pymol.

Os resultados estruturais eram coerentes com os resultados de atividade enzimática realizada para as enzimas LmDHODH e TcDHODH e que demonstravam o caráter irreversível destes compostos testados. Neste modelo, as moléculas, ou fragmentos liberados posteriormente ao ataque da enzima, se ligavam irreversivelmente a cisteína catalítica da enzima. Embora o mecanismo de quebra das moléculas originalmente testadas ainda não foi completamente elucidado, nossa hipótese é a de que os inibidores teriam sido atacados pelas duas cisteínas, em dois diferentes pontos, clivando-o em um fragmento menor.

Na tentativa de elucidar o mecanismo de ataque da enzima às moléculas testadas, decidimos por realizar estudos cinéticos/inibitórios e estruturais na presença de pequenos fragmentos que pudessem mimetizar o comportamento das moléculas durante o ataque da enzima. Desta forma, realizamos estudos de inibição enzimática com as moléculas: Fenil isotiocianato, 4-Nitrofenil isotiocianato, 2-Aminotiazol e Isotiocianato de metila.

4.4.3.3.1. Fragmentos dos compostos com atividade anti-leishmania

Na tentativa de identificar o sítio de interação das moléculas, bem como compreender o mecanismo de inibição destes compostos frente às enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, a enzima LmDHODH foi co-cristalizada e a estrutura determinada com os ligantes fenil isotiocianato e 4-nitrofenil isotiocianato,. Detalhes envolvendo a coleta de dados, estatísticas de refinamento e parâmetros do modelo estão compilados na **Tabela 23**. As estruturas cristalográficas de ambos os complexos encontram-se em período de validação para serem depositadas no banco de dados Protein Data Bank (PDB).

Tabela 23 – Dados cristalográficos e estatísticos para os conjuntos de dados coletado no LNLS ($\lambda=1,461$ e $1,305\text{\AA}$ para os complexos com Fenil isotiocianato e 4-Nitrofenil isotiocianato, respectivamente), a 100 K, coletados do LNLS Brasil, W01B-MX2. Os valores relativos à última camada de resolução estão mostrados entre parênteses, quando apropriado

Dados e Parâmetros	LmDHODH Fenil isotiocianato	LmDHODH 4-Nitrofenil isotiocianato
Coleta de Dados		
Sistema Cristalino	Hexagonal	Hexagonal
Grupo espacial	P6 ₁	P6 ₁
Parâmetros de rede (Å)	a=b=144,19, c=69,87	a=b=143,91, c=69,62
Intervalo de Resolução (Å)	22,43 – 1,56 (1,65 – 1,56)	23,47 – 1,60 (1,69 – 1,60)
Moléculas por unidade assimétrica	2	2
Completeza (%)	99,9 (100)	100 (100)
I / sigma(I)	18,2 (7,8)	17,6 (4,1)
^a R _{sym} (%)	7,7 (21,8)	9,3 (77,0)
Nº reflexões únicas	116.828 (16.994)	108.237 (15.723)
Multiplicidade	8,8 (7,8)	11,7 (11,0)
Refinamento da Estrutura		
Resolução (Å)	22,43 – 1,56	22,68 – 1,60
Fator de temperatura médio (Å ²)	17,10	16,72
^b R _{factor}	17,49	20,72
^c R _{free}	19,61	22,80
Ângulos de ligação – rmsd (°)	2,7990	2,9310
Comprimento de ligação – rmsd (Å)	0,0311	0,0314
Ramachandram		
Região mais favorável (%)	95,75	96,47
Região adicional permitida (%)	4,25	3,53

^a $R_{sym} = \sum |I_{obs} - \langle I \rangle| / \sum I_{obs}$ onde $\langle I \rangle$ é a média das intensidades calculada a partir das observações para as reflexões relacionadas por simetria.

^b $R_{factor} = \sum |F_{obs} - F_{calc}| / \sum F_{obs}$, onde F_{obs} e F_{calc} são os fatores de estrutura observado e calculado, respectivamente.

^c R_{free} é como R_{factor} mas somado ao longo do 5 % das reflexões do conjunto teste.

O mapa de densidade eletrônica contínuo e de boa qualidade (**Figura 78**) comprovou o modo de interação covalente entre os dois ligantes e a Cys150 da enzima LmDHODH no sítio S2, consequência do ataque do grupamento SH da Cys150 ao carbono do grupamento isotiocianato dos ligantes **Figura 79**.

Figura 78: Mapa de densidade eletrônica final 2Fo-Fc contornado a 1.0 σ associado com os ligantes **(a)** fenil isotiocianato e **(b)** 4-nitrofenil isotiocianato, complexados com a enzima LmDHODH. O mapa de densidade eletrônica contínuo mostra claramente a ligação covalente entre ambos os ligantes e a Cys150 da enzima. Os ligantes estão coloridos de acordo com o tipo de átomo: carbono em verde; nitrogênio em azul; oxigênio em vermelho; enxofre em amarelo. Figura gerada no programa Pymol.

Figura 79: Mecanismo catalítico da interação dos inibidores com a Cys150 da enzima LmDHODH.

Apesar dos resultados estruturais estarem de acordo com os dados de inibição enzimática determinados para a enzima LmDHODH, eles não são capazes de explicar a inibição enzimática também identificada contra a enzima TcDHODH-Y (**Tabela 16**), isto porque, o resíduo Cys150 na enzima LmDHODH, sítio de interação destes ligantes, é substituído pela Tyr151 em TcDHODH-Y. A grande diferença quanto ao grau de reatividade destes resíduos sugere que o mecanismo de inibição destas moléculas é distinto quando comparando as enzimas LmDHODH e TcDHODH-Y. Uma análise detalhada da estrutura da enzima TcDHODH-Y não nos permitiu identificar nenhuma outra região onde pudéssemos facilmente prever a interação destes ligantes. Uma hipótese levantada é a de que estes ligantes podem

estar indo diretamente ao sítio catalítico e interagindo com a cisteína catalítica Cys132 (numeração referente à enzima TcDHODH-Y). Esforços para cristalizar a enzima TcDHODH-Y em complexo com os ligantes fenil isotiocianato e 4-nitrofenil isotiocianato se encontram em andamento de forma a caracterizar o mecanismo de ação destas moléculas contra a enzima TcDHODH-Y.

Apesar de ambos os ligantes terem interagido da mesma forma e, consequentemente, no mesmo sítio (sítio S2), as estruturas cristalográficas destes complexos apresentam diferenças estruturais relevantes quanto à posição da alça catalítica **Figura 80**.

Figura 80: Representação de um monômero da enzima LmDHODH complexada com as moléculas **(a)** fenil isotiocianato e **(b)** 4-nitrofenil isotiocianato. Os ligantes (representado em verde) interagem covalentemente com a CYS150. Ambos interagem no mesmo sítio, sítio S2, presente atrás da alça catalítica (representada em vermelho). Apesar de manter a mesma interação, os compostos estão posicionados de forma sutilmente diferente. Na comparação das figuras podemos notar claramente a diferença da posição adotada pela alça catalítica.

A caracterização estrutural da enzima LmDHODH complexada com o ligante fenil-isotiocianato demonstrou que a interação deste composto no sítio S2 não interfere significativamente na abertura da alça catalítica, uma vez que esta foi resolvida na conformação aberta, permitindo a passagem do substrato/produto entre o sítio (S1) e o exterior da enzima (**Figura 81(a)**)(resultados não apresentado). De fato, ao analisarmos os resultados de inibição enzimática (**Tabela 16**), este composto se mostrou capaz de interferir fracamente na atividade da enzima LmDHODH, quando comparado com o resultado obtido para o inibidor 4-nitrofenil-

isotiocianato. Já o ligante 4-nitrofenil-isotiocianato, por ser maior e possuir uma distribuição química distinta, interfere na mobilidade da alça catalítica, impedindo sua abertura total. A caracterização estrutural deste complexo demonstrou claramente que tal impedimento é causado pela presença do grupamento nitro na posição *para* do grupamento fenil do inibidor (**Figura 81(b)**). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos nos ensaios de inibição enzimática, onde a presença deste ligante acarretou em uma diminuição efetiva da atividade enzimática.

Figura 81: Representação na forma de superfície de van der Waals, em azul, de parte da enzima LmDHODH em complexo com os ligantes **(a)** LmDHODH-Fenil-isotiocianato e **(b)** LmDHODH-4-Nitrofenil-isotiocianato. A região que corresponde a alça catalítica de cada complexo está representada em amarelo. Os ligantes estão representados na forma de "sticks" em verde. A superfície de van der Waals referente à Cys150 também está representada em verde. Na imagem **(a)** é possível visualizar o FMN, representado na forma de "sticks" em amarelo, pois a alça catalítica do complexo (amarelo) encontra-se na posição aberta, voltado para o sítio S2. Na imagem **(b)** a conformação fechada da alça fecha a entrada do sítio S1, mostrando a acomodação do ligante atrás da alça.

A informação estrutural obtida com a determinação das estruturas dos complexos LmDHODH-fenil-isotiocianato e LmDHODH-4-nitrofenil-isotiocianato trouxe não só importantes informações quanto ao mecanismo de inibição destas moléculas, mas teve um papel crucial na compreensão do mecanismo catalítico das enzimas DHODH da classe 1A. O mapeamento da posição aberta da alça catalítica na estrutura do complexo com o ligante fenil-isotiocianato demonstrou a direção do movimento da alça durante a catálise. Anteriormente acreditava-se que a alça se movia na direção do sítio S3 e o acesso ao sítio ativo pelo substrato era conseguido

através do sítio S2. Na verdade, foi baseado nesta hipótese que os primeiros experimentos de docagem foram realizados. No entanto, a determinação da estrutura cristalográfica destes compostos demonstra que ao contrário do que se pensava, a alça catalítica se movimenta na direção do sítio S2 e que o acesso ao sítio ativo se dá pelos sítios S3-S4. (**Figura 82**). Estes resultados são extremamente importantes, porque com a modelagem da alça na conformação aberta foi possível agora mapear uma nova configuração para o sítio S3, de forma a ser explorado como um novo sítio para o planejamento de ligantes. Além disso, estes resultados sugerem que uma estratégia eficiente de inibição a ser testada envolve o planejamento de moléculas que interajam no sítio ativo S1 crescendo em direção ao sítio S3.

Figura 82: Representação esquemática dos sítios encontrados nas enzimas DHODHs da classe 1A. Em azul e verde, estão representados os dois monômeros que compõem o dímero funcional. A localização de alguns resíduos chave estão identificadas na figura. Na figura (a) a alça catalítica (em rosa) encontra-se na posição fechada, assim o sítio S1 não tem acesso ao solvente. O acesso ao sítio S1 pelo sítio S2 ou S3 está bloqueado (orientação do bloqueio representada com setas vermelhas). Nesta situação, apenas os sítios S2, S3, S4 e S5 tem acesso ao solvente. Na figura (b) a alça catalítica (em rosa) encontra-se aberta, demonstrando que o acesso ao sítio S1 ocorre via sítio S3-S4 (seta preta). Nesta situação, todos os sítios passam a ter acesso ao solvente.

Em suma, esta caracterização estrutural nos permitiu verificar que o movimento da alça catalítica é fundamental para a manutenção da atividade catalítica, através da determinação da estrutura cristalográfica da enzima complexada com o inibidor 4-nitrofenil-isotiocianato, e valida o sítio S2 como potencial sítio para buscas de inibidores. Além disso, nossos resultados guiam o planejamento de inibidores para as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos para uma nova perspectiva, onde essa nova busca pode ser realizada de uma forma mais fundamentada e precisa.

5. CONCLUSÕES

A enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) catalisa a conversão de diidroorotato em orotato, a quarta e única reação redox da via metabólica de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina. DHODH tem sido explorada como alvo validado para terapias contra doenças proliferativas e parasitárias e, em particular, tem sido considerada um alvo atraente para o planejamento de fármacos com ação contra tripanossomatídeos.

No desenvolvimento do presente projeto utilizamos a combinação de diferentes estratégias, como tecnologia do DNA recombinante, termofluor, cristalografia de raios-X, docagem e ensaios de inibição contra moléculas sintéticas e de origem natural, na busca de inibidores potentes e seletivos contra as enzimas dos tripanossomatídeos *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*.

O desenvolvimento deste trabalho iniciou-se com a idéia de se identificar diferentes sítios que poderiam ser utilizados como alvo para o desenvolvimento de inibidores específicos contra as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos. Desta forma, diferenças estruturais entre as enzimas de tripanossomatídeos e humana foram exploradas, permitindo a identificação de cinco sítios, nomeados de S1 a S5 de acordo com a distância do sítio ativo.

A primeira busca de inibidores para as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos envolveu três hipóteses. Na primeira, buscamos moléculas para interagirem no sítio ativo, explorando as pequenas diferenças entre as enzimas da classe 1A e 2 existentes neste sítio, principalmente àquelas presentes em torno da região do carbono C5 do orotato, onde ocorre a substituição do resíduo Leu72 (LmDHODH) e Leu73 (TcDHODH-Y) pelo resíduo Phe149 (HsDHODH). Os inibidores identificados foram caracterizados estruturalmente através da determinação da estrutura cristalográfica dos complexos com a enzima LmDHODH (PDB códigos 3MHU e 3MJY), e os resultados obtidos nos levaram a crer que a obtenção de inibidores mais potentes e seletivos poderiam ser obtidos, através da adição de substituintes maiores na direção do carbono C5 do orotato. Nosso objetivo era o de identificar novas moléculas que interagiriam no sítio ativo (S1) e cujo grupo poderia ocupar o sítio S2. As evidências que tínhamos naquele momento era a de que com a abertura da alça catalítica, o sítio S1 teria acesso ao solvente via sítio S2. Assim, a busca voltada para a identificação de uma nova coleção de compostos, denominada segunda geração, foi focada na obtenção de moléculas capazes de

interagir simultaneamente nos sítios S1 e S2. A segunda hipótese adotada por nós durante a primeira busca de inibidores, envolvia a identificação de moléculas capazes de interagir nos sítios S3 e S4 simultaneamente, para que, desta forma, pudessem alterar a atividade enzimática das enzimas de tripanossomatídeos, através da interferência na mobilidade da alça catalítica. Além disso, tínhamos evidências e acreditávamos que a alça catalítica abria em direção aos sítios S3 e S4, permitindo, então, o acesso das moléculas ao sítio S1 através da passagem pelo sítio S2. Já a terceira hipótese levantada durante as primeiras tentativas da obtenção de ligantes, foi a de explorar o sítio S5, sítio este situado na interface dimérica das enzimas da classe 1A das DHODHs e que, portanto, não está presente na enzima humana. Uma vez que estudos anteriores com a enzima de LIDHODH-A demonstraram a importância da dimerização para a atividade catalítica das enzimas pertencentes a esta classe, acreditávamos que um ligante planejado para interagir neste sítio poderia alterar a dinâmica dessas moléculas e, conseqüentemente, interferirem na atividade enzimática. No entanto, devido ao pequeno tamanho da cavidade S5, nenhuma molécula pode ser identificada por docagem para este sítio. Em paralelo, através da varredura em biblioteca de compostos por Termofluor, foi possível identificar uma série de pequenas moléculas análogas entre si que atribuíram estabilidade térmica às enzimas DHODHs de tripanossomatídeos. A caracterização estrutural demonstrava que estes ligantes poderiam sim estar interferindo no controle do sítio ativo, uma vez que o resíduo presente em uma das bases desta alça (Tyr142 na enzima LmDHODH) compunha majoritariamente o sítio S5. Para obtermos respostas aos nossos questionamentos, ensaios de mutagênese sítio dirigida realizados em nosso grupo de pesquisa, o LCP-RP, envolvendo os resíduos presentes no sítio S5, comprovaram a relação destes resíduos com a segunda etapa reacional. Assim, começávamos não apenas mais trabalhar na busca de sítios e inibidores, mas sim, de forma pioneira, passávamos a compreender também mecanismos catalíticos das enzimas DHODHs da classe 1A que ainda não tinham sido desvendados pela comunidade científica.

Ainda tentando alcançar o objetivo da proposta inicial, novos esforços foram realizados na busca *in silico* de moléculas bioativas mais potentes e seletivas, concomitantemente com a busca *in vitro* de inibidores em biblioteca de compostos sintéticos com atividade antiparasitária já avaliada. Nesta nova etapa, foram obtidos

inibidores para o sítio S1 com uma pequena extensão em direção ao sítio S2, que apresentaram atividade seletiva contra as enzimas DHODHs de tripanossomatídeos, e também a identificação de potentes inibidores oriundos de bibliotecas de compostos sintéticos. No entanto, tivemos dificuldades para a obtenção de dados estruturais destes complexos, sendo que a única evidência que tínhamos era a de que estes ligantes poderiam estar sendo atacados tanto pela cisteína catalítica Cys131 quanto pela Cys150 (presente apenas na enzima LmDHODH) e, em alguns casos por ambas simultaneamente. Este tipo de interação passava a ser cada vez mais comum dentre os compostos que estavam sendo avaliados, o que nos levou a questionar hipóteses sobre grupos funcionais propícios a este tipo de ataque. E foi neste momento que identificamos compostos como o 4-nitrofenil-isotiocianato e o fenil-isotiocianato. A caracterização estrutural destes compostos permitiu a validação pioneira do sítio S2 como potencial para o planejamento de inibidores seletivos e específicos, através da caracterização das posições e dos movimentos da alça catalítica, bem como a validação de que sua mobilidade é essencial para a manutenção da atividade catalítica.

Finalmente, o efeito leishmanicida observado em nossos ensaios anti-promastigota e os baixos níveis de citotoxicidade observados em células de mamíferos sugerem que alguns dos compostos identificados durante o desenvolvimento deste projeto como potentes inibidores da enzima DHODH poderão ser usados como protótipos para o desenvolvimento de drogas com ação leishmanicida e tripanocida. Combinados, nossos resultados forneceram uma nova e importante contribuição para a compreensão do mecanismo de ação das enzimas DHODH da classe 1A e para o desenho de fármacos baseado nas estruturas das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*. Além disso, a alta identidade sequencial e estrutural observada entre as enzimas de tripanossomatídeos sugerem que uma única estratégia para o desenho de inibidores baseado em estrutura poderá ser usada para explorar a enzima DHODH como alvo terapêutico para várias doenças negligenciadas tropicais como Leishmaniose, Doença do sono e Doença de Chagas.

6. REFERÊNCIAS

- ALARCÓN DE NOYA, B. et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. **Journal of Infectious Disease**, v. 201, n. 9, p. 1308-1315, 2010.
- ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 10, p. 853-882, 2003.
- ALVAREZ, J. C. High-throughput docking as a source of novel drug leads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 4, p. 365-370, 2004.
- ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. **Chemistry & Biology**, v. 10, n. 9, p. 787-797, 2003.
- 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. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60, n. 1, p. 113-127, 2005.
- ARAKAKI, T. L. et al. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 37-50, 2008.
- BAKER, M. C. et al. Mapping, monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: towards a policy framework. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 231-238, 2010.
- BAILEY, S. The CCP4 suite - programs for protein crystallography. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 50, p. 760-763, 1994.
- BAURIN, N. et al. Drug-like annotation and duplicate analysis of a 23-supplier chemical database totalling 2.7 million compounds. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 2, p. 643-651, 2004.
- BERRIMAN, M. Data mining parasite genomes. **Parasitology**, v. 128, p. S23-31, 2004.
- BJORNBERG, O. et al. Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* investigated by chemical modification and mutagenesis. **Biochemistry**, v. 36, n. 51, p. 16197-16205, 1997.
- BLEICHER, K. H. et al. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 369-378, 2003.
- BLUNDELL, T. L. Structure-based drug design. **Nature**, v. 384, n. 6604, p. 23-26, 1996.
-

- BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 32, p. 335-373, 2003.
- 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. **Investigational New Drugs**, v. 16, n. 1, p. 19-27, 1998.
- CARR, R. A. et al. Fragment-based lead discovery: leads by design. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 14, p. 987-992, 2005.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- _____. Tripanosomíase americana: forma aguda da molestia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p. 37-60, 1916.
- CHELESKI, J. et al. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 5899-5909, 2010.
- CHEN, S. F. et al. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase-activity by brequinar sodium. **Cancer Research**, v. 52, n. 13, p. 3521-3527, 1992.
- CHIRAC, P.; TORREELE, E. Global framework on essential health R&D. **Lancet**, v. 367, n. 9522, p. 1560-1561, 2006.
- CHRISTOPHERSON, R. I.; LYONS, S. D.; WILSON, P. K. Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 11, p. 961-971, 2002.
- CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S4-S5, 2010.
- CORDEIRO, A. T.; FELICIANO, P. R.; NONATO, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, p. 1049-1051, 2006.
- CORDEIRO, A.T.; FELICIANO, P.R.; PINHEIRO, M.P.; NONATO, M.C. Crystal structure of dihydroorotate dehydrogenase from *Leishmania major*. **Biochimie**. Trabalho submetido.
- CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical-clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- COTERON, J. et al. Structure-Guided Lead optimization of triazolopyrimidine-ring substituents identifies potent *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase
-

- inhibitors with clinical candidate potential. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5540-5561, 2011.
- COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - a background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 113-122, 2007.
- COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.
- COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S6-S7, 2010.
- COUTO, S.; NONATO, M.; COSTA-FILHO, A. Defects in vesicle core induced by *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase. **Biophysical Journal**, v. 94, n. 5, p. 1746-1753, 2008.
- CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 899-905, 2001.
- CROFT, S. L.; BARRETT, M. P.; URBINA, J. A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 508-512, 2005.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.
- CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.
- CUMMINGS, M.; FARNUM, M.; NELEN, M. Universal screening methods and applications of ThermoFluor (R). **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 854-863, 2006.
- DIAS, J. C. P.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America - A review. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.
- EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography**, v. 60, p. 2126-2132, 2004.
- EMSLEY, P. et al. Features and development of Coot. **Acta Crystallographica Section D - Biological Crystallography**, v. 66, p. 486-501, 2010.
-

Eradicating infectious diseases in 2010. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 2-2, 2010.

ERICSSON, U. et al. Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v. 357, n. 2, p. 289-298, 2006.

EVANS, P.R. **Joint CCP4 and ESF-EACBM Newsletter on Protein Crystallography**, v.33, p.22-24, 1997.

FAGAN, R. L. et al. Mechanism of flavin reduction in the class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4028-4036, 2007.

FAIRBANKS, L. et al. Importance of ribonucleotide availability to proliferating T-Lymphocytes from healthy humans - disproportionate expansion of pyrimidine pools and contrasting effects of de novo synthesis inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 50, p. 29682-29689, 1995.

FAIRLAMB, A. H. et al. Trypanothione - a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione-reductase in trypanosomatids. **Science**, v. 227, n. 4693, p. 1485-1487, 1985.

FELICIANO, P. R. et al. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Protein Expression and Purification**, v. 48, n. 1, p. 98-103, 2006.

FRIESNER, R. A. et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739-1749, 2004.

GALLIVAN, J.; DOUGHERTY, D. Cation-pi interactions in structural biology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 17, p. 9459-9464, 1999.

GAO, G. H. et al. Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 1, p. 149-161, 1999.

GHOSH, S. et al. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 3, p. 194-202, 2006.

GOLDENBERG, M. M. Leflunomide, a novel immunomodulator for the treatment of active rheumatoid arthritis. **Clinical Therapeutics**, v. 21, n. 11, p. 1837-1852, 1999.

GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.

- GRANT, I. H. et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 10, p. 849-851, 1989.
- GUDIN, S. et al. *Trypanosoma brucei*: a survey of pyrimidine transport activities. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 2, p. 118-125, 2006.
- GUIMARÃES, B. G. et al. The MX2 macromolecular crystallography beamline: a wiggler X-ray source at the LNLS. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 16, n. 1, p. 69-75, 2009.
- GURTLER, R. E. et al. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 41, p. 16194-16199, 2007.
- GYAPONG, J. O. et al. Integration of control of neglected tropical diseases into health-care systems: challenges and opportunities. **Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 160-165, 2010.
- HAGAR, J. M.; RAHIMTOOLA, S. H. Chagas' heart disease in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 11, p. 763-768, 1991.
- HANSEN, M. et al. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. **Protein Science**, v. 13, n. 4, p. 1031-1042, 2004.
- HARDER, A.; HABERKORN, A. Possible mode of action of toltrazuril - studies on 2 *Eimeria* species and mammalian and *Ascaris-suum* enzymes. **Parasitology Research**, v. 76, n. 1, p. 8-12, 1989.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- _____. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 659-688, 2001.
- HUBBARD, R. E. Structure-based drug discovery and protein targets in the CNS. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 1, p. 7-23, 2011.
- HURT, D. E.; WIDOM, J.; CLARDY, J. Structure of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 62, p. 312-323, 2006.
- 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**, v. 47, n. 41, p. 10881-10891, 2008.
-

- ITTARAT, I. et al. Effects of atovaquone and other inhibitors on *Pneumocystis-carinii* dihydroorotate dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 2, p. 325-328, 1995.
- IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.
- JACOBSON, M. P. et al. A hierarchical approach to all-atom protein loop prediction. **Proteins**, v. 55, n. 2, p. 351-367, 2004.
- JANCARIK, J.; KIM, S. H. Sparse-matrix sampling - a screening method for crystallization of proteins. **Journal of Applied Crystallography**, v. 24, p. 409-411, 1991.
- JOCKEL, J.; WENDT, B.; LOFFLER, M. Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 8, p. 1053-1060, 1998.
- JONES, M. E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals - genes, enzymes, and regulation of ump biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 253-279, 1980.
- JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1813-1818, 2004.
- JURADO, L. A.; MACHIN, I.; URBINA, J. A. *Trypanosoma cruzi* phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP-dependent): Transition metal ion requirement for activity and sulfhydryl group reactivity. **Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 1, p. 188-196, 1996.
- KRIPPENDORFF, B. F. et al. Mechanism-based inhibition: deriving K(I) and k(inact) directly from time-dependent IC(50) values. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 14, n. 8, p. 913-23, 2009.
- KUNTZ, I. D. et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269-288, 1982.
- LASKOWSKI, R. A. et al. Procheck - a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, p. 283-291, 1993.
- LASKOWSKI, R. A.; MACARTHUR, M. W.; THORNTON, J. M. Validation of protein models derived from experiment. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, n. 5, p. 631-639, 1998.
- LAU, H. et al. Efficacies of lipophilic inhibitors of dihydrofolate reductase against parasitic protozoa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 1, p. 187-195, 2001.
-

- LEIBY, D. A. et al. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas' disease, in US blood donors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 4, p. 1047-1052, 1997.
- LEIFSO, K. et al. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: the *Leishmania* genome is constitutively expressed. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35-46, 2007.
- LESLIE, A. et al. Processing diffraction data with MOSFLM. **Evolving Methods for Macromolecular Crystallography**, v. 245, p. 41-51, 2007.
- LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 67-76, 2010.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.
- LIU, S. P. et al. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Structure with Folding & Design**, v. 8, n. 1, p. 25-33, 2000.
- LIU, Y. et al. Structure of the putative dihydroorotate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. **Acta Crystallographica Section F - Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 67, n. 2, p. 182-187, 2011.
- LO, M. et al. Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. **Analytical Biochemistry**, v. 332, n. 1, p. 153-159, 2004.
- LOFFLER, M. et al. Dihydroorotate-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the biosynthesis of pyrimidine nucleotides. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 174, n. 1-2, p. 125-129, 1997.
- MAGILL, A. J. Epidemiology of the leishmaniasis. **Dermatologic Clinics**, v. 13, n. 3, p. 505-523, 1995.
- MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 617521, 2010.
- MARTINEZ-DIAZ, R. A. et al. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 53-59, 2001.
- MATULIS, D. et al. Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: Measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. **Biochemistry**, v. 44, n. 13, p. 5258-5266, 2005.
-

MCDONALD, C. A.; PALFEY, B. A. Substrate binding and reactivity are not linked: grafting a proton-transfer network into a Class 1A dihydroorotate dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 50, n. 14, p. 2714-2716, 2011.

MCPHERSON, A. **Preparation and Analysis of Protein Crystals**. New York: John Wiley & Sons, 1982, 371p.

MILES, M. A. Orally acquired Chagas disease: lessons from an urban school outbreak. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, n. 9, p. 1282-1284, 2010.

MILLER, M. A. Chemical database techniques in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 220-227, 2002.

MILLER, R. W. Dihydroorotate dehydrogenase (Neurospora). **Methods in Enzymology**, v. 51, p. 63-69, 1978.

MORAN, M. et al. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Medicine**, v. 6, n. 2, p. e30, 2009.

MUEGGE, I. Selection criteria for drug-like compounds. **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 3, p. 302-321, 2003.

MURSHUDOV, G. N.; VAGIN, A. A.; DODSON, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. **Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography**, v. 53, p. 240-255, 1997.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. Tradução Simões, A.A.; Kettelhut, I.C; Valim, Y.M.L.; Curti, C.; Vugman, I.; Rotschild, Z.; Rechia, C.G.V; Rodrigues, V.; Lodi, W.R.N; Leone, F.A; Galban, V.D. 3ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.

NIELSEN, F. S.; ANDERSEN, P. S.; JENSEN, K. F. The B form of dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis* consists of two different subunits, encoded by the pyrDb and pyrK genes, and contains FMN, FAD, and [FeS] redox centers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 29359-29365, 1996.

NIESEN, F.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212-2221, 2007.

NORAGER, S. et al. *E. coli* dihydroorotate dehydrogenase reveals structural and functional distinctions between different classes of dihydroorotate dehydrogenases. **Structure**, v. 10, n. 9, p. 1211-1223, 2002.

NORAGER, S. et al. *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 28812-28822, 2003.

- ODA, A. et al. Comparison of consensus scoring strategies for evaluating computational models of protein-ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 1, p. 380-391, 2006.
- OPREA, T. I. et al. Lead-like, drug-like or "pub-like": how different are they? **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 21, n. 1-3, p. 113-119, 2007.
- OTTOSEN, M. B. et al. The dimeric dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* dissociates reversibly into inactive monomers. **Protein Science**, v. 11, n. 11, p. 2575-2583, 2002.
- PALFEY, B. A.; BJÖRNBERG, O.; JENSEN, K. F. Specific inhibition of a family 1A dihydroorotate dehydrogenase by benzoate pyrimidine analogues. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 18, p. 2861-2864, 2001.
- PANTOLIANO, M. et al. High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, n. 6, p. 429-440, 2001.
- PAVÃO, F. et al. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS Letters**, v. 520, n. 1-3, p. 13-17, 2002.
- PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, v. 465, n. 7301, p. S10-S11, 2010.
- PINHEIRO, M. P.; IULEK, J.; NONATO, M. C. Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase from Y strain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 369, n. 3, p. 812-817, 2008.
- POLIKARPOV, I. et al. Set-up and experimental parameters of the protein crystallography beamline at the Brazilian National Synchrotron Laboratory. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 5, p. 72-76, 1998.
- 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**, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
- _____. Structure of dihydroorotate dehydrogenase B: Electron transfer between two flavin groups bridged by an iron-sulphur cluster. **Structure**, v. 8, n. 12, p. 1227-1238, 2000.
- SOARES, M. B.; SANTOS, R. R. Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 325-332, 2009.
- STIERAND, K.; RAREY, M. From modeling to medicinal chemistry: automatic generation of two-dimensional complex diagrams. **ChemMedChem**, v. 2, n. 6, p. 853-860, 2007.
-

SUN, F. et al. Design and structure-based study of new potential FKBP12 inhibitors. **Biophysical Journal**, v. 85, n. 5, p. 3194-3201, 2003.

TAKASHIMA, E. et al. Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 122, n. 2, p. 189-200, 2002.

_____. Expression, purification and crystallization of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with orotate. **Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 61, p. 875-878, 2005.

TEAGUE, S. J. et al. The Design of Leadlike Combinatorial Libraries. **Angewandte Chemie (International Ed. in English)**, v. 38, n. 24, p. 3743-3748, 1999.

VAGIN, A.; TEPLYAKOV, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. **Journal of Applied Crystallography**, v. 30, p. 1022-1025, 1997.

WERMUTH, C. G. Medicinal chemistry: definitions and objectives, the three main phases of drug activity, drug and disease classifications. In: THE PRACTICE OF MEDICINAL CHEMISTRY. Amsterdam: Academic Press, 2003. p.29-31.