

JULIANA CHELESKI

**Planejamento de Inibidores da Enzima Diidroorotato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*
por biocalorimetria**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari

São Carlos

2011

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original, sob a exclusiva responsabilidade do autor.

São Carlos, ____/____/____

Juliana Cheleski

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Josmar e Jussara Cheleski, ao meu irmão Jefferson, por existirem.
Ao conhecimento que nos impulsiona a luz.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelas pessoas que encontrei, pelos livros que li.

Aos meus pais, Josmar e Jussara, pelo exemplo de união e amor pela vida. Ao meu irmão Jefferson Cheleski, pela amizade e pelas palavras de carinho.

Ao meu amado Helton Wiggers.

Ao Prof. Dr. Carlos Montanari pela orientação e pelo voto de confiança por ter me aceitado no seu laboratório.

A Malu Montanari por ser nossa *mãe* em todos os momentos desta caminhada.

Aos amigos que compartilharam comigo inúmeros momentos de alegria, tristeza, pescarias, congressos, artigos, roda de violão: Geraldo, Renato e Mábia Freitas, Josmar e Adriane, Rafael, Peter Kenny, Vinicius, Bauab, Fabio e Patrícia, Guiga e Roberto, Andrei e Patrícia, Igor e Aline (e a todos os meninos da republica do Igor).

Ao Grupo NEQUIMED-PN: Emanuella Fonseca (e sua mãe), Fabyana e Ricardo, Jean, Juliane, Aderson, pelas jornadas de trabalho. A Fabiana Rossini, pela disposição de nos ajudar e ser nossa 'chefa'.

Um agradecimento especial para a Prof.^a Dra. Cristina Nonato (Faculdade de Farmácia de Ribeirão Preto/USP) e ao Matheus Pinheiro pela colaboração científica.

Ao grupo de Biologia Molecular e Bioquímica (IQSC) pela amizade. A mãe Sabrina, pelas horas de alegria e por me dar à honra de cuidar por um momento da Beatriz. A Natalia, pela companhia e os momentos de espera, para a Beatriz vir ao mundo.

Ao grupo de Biofísica Molecular 'Sérgio Mascarenhas': Andressa, Bel (que me chama de Karina), Joci, Ana Paula Citadini, Jaba pela colaboração e dedicação para me ensinar.

A todos meus conterrâneos de Guarapuava /Paraná.

Aos professores do departamento de Química da Universidade Estadual do Centro Oeste Paraná/ Unicentro.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação de Amparo a pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo 2007/05424-2) pelo suporte financeiro.

"Há duas formas de conhecimento: o legítimo e o ilegítimo. Ao ilegítimo pertencem todos estes: a visão, a audição, o olfato, o paladar e o tato. O legítimo, porém, está separado daquele".

Demócrito

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, é uma doença tropical que enseja morte/morbidade de milhões de pessoas na América Latina. Por processos migratórios, vem-se estendendo ao sul dos Estados Unidos, Canadá, Europa, Austrália e Japão. Essa doença tem sido considerada *super-negligenciada* pela indústria farmacêutica, já que os dois fármacos disponíveis para o seu tratamento foram introduzidos há mais de quarenta anos e apresentam baixa eficácia com vários efeitos colaterais severos. Mais recentemente, a Organização Mundial da Saúde considerou a doença de Chagas, dentre outras, como a *doença da pobreza*! Com esse cenário completamente desfavorável aos portadores da doença, é necessária a descoberta, desenvolvimento e introdução de novos fármacos para o tratamento eficiente e seguro da doença de Chagas.

Dentro desse contexto, este trabalho representa uma importante contribuição para o entendimento das razões moleculares da ação farmacológica de substâncias químicas bioativas de interesse à farmacoterapia da doença de Chagas. Ao nível molecular, a enzima pertencente à via de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas, diidroorotato desidrogenase do *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), é um alvo promissor para a descoberta e desenvolvimento de candidatos a fármacos de interesse para o tratamento da doença de Chagas.

Os conceitos e ferramentas da química medicinal computacional, tais como os ensaios virtuais *in silico*, foram usados para a identificação de inibidores da TcDHODH. Vinte e seis substâncias inéditas como inibidores da TcDHODH foram adquiridos comercialmente e avaliados experimentalmente através da Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) para a determinação do mecanismo de inibição e da constante cinética de afinidade (K_i^{app}).

Na etapa de docagem molecular, o objetivo era identificar moléculas que apresentassem uma boa afinidade pelo sítio ativo da enzima TcDHODH. A primeira série de ligantes selecionados dos métodos *in silico*, apresentou inibição enzimática na concentração de micromolar com eficiência média de ligante de $0,50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$. Devido à baixa massa molecular (aproximadamente 200 kDa) e a alta eficiência de ligante, essa série foi considerada como constituída de excelentes substâncias com elevado poder de reconhecimento biomolecular. Por isso, foram caracterizadas como substâncias passíveis de otimização no processo *do-ligante-para-substância matriz*.

As enzimas TcDHODH e DHODH de *Leishmania major* (LmDHODH) têm sítios ativos com elevado grau de similaridade. Portanto, usando a enzima LmDHODH como padrão de substituição da TcDHODH é possível fazer a descrição do modo de interação do co-complexo TcDHODH-inibidor. O modo de ação descrito através da resolução da estrutura cristalográfica de raios-X, além de validar ortogonalmente os resultados cinéticos obtidos por ITC – que identificou as substâncias como inibidores competitivos (por interação direta no sítio ativo da enzima TcDHODH), geraram hipóteses farmacofóricas para a busca de novas moléculas (chamadas de segunda geração), agora com padrão superior de reconhecimento molecular do sítio da TcDHODH. Para validar complementarmente a hipótese, foi demonstrado que os inibidores da TcDHODH inibem, similarmente, a LmDHODH.

Uma análise cuidadosa da estrutura tridimensional da enzima TcDHODH, demonstrou a possibilidade de ocupação do sítio S2 que se estende além da região do sítio catalítico S1, permitindo assim o aumento da afinidade biomolecular com os inibidores. Além disso, o sítio S2 não é encontrado na estrutura da proteína de humanos (HsDHODH), podendo ser uma região passível de seletividade frente à enzima TcDHODH.

O emprego adequado dessa hipótese resultou na otimização dos ligantes identificados previamente para substâncias mais potentes que inibiram a enzima de forma competitiva em relação ao substrato diidroorotato (DHO) em valores K_i^{app} de 121 ± 14 nM e 190 ± 10 nM.

A técnica de ITC foi fundamental no processo de descoberta de inibidores enzimáticos, pois se mostrou extremamente susceptível à determinação da interação intermolecular enzima-inibidor, permitindo acompanhar a cinética da reação e obter os valores da constante de afinidade de maneira precisa e acurada. Com isso, a taxa de acerto obtida nesta tese foi de 46%, considerando-se apenas as substâncias com valores de $K_i^{app} < 100$ μ M. Esse é um número favoravelmente apreciável, já que na literatura ele gira em torno de 1-10% quando o planejamento *in silico* é realizado, quando comparado às taxas de acerto dos métodos de ensaio em larga escala (HTS), entre 0-2 %, os resultados alcançados neste trabalho são ainda mais significativos.

Além disso, as substâncias químicas selecionadas através da integração de métodos *in silico* e biocalorimétricos apresentam elevado grau de complexidade no processo biomolecular de interação enzima-ligante, que permite classificá-las para as fases seguintes da gênese planejada de fármacos.

ABSTRACT

American trypanosomiasis or Chagas disease, caused by the haemoflagellate *Trypanosoma cruzi*, is a tropical disease that affects millions of people in Latin America. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries is attained by immigration as the disease also affects people in the United States, Canada, Europe, Australia and Japan. However, the United States are not to be written off as an area of nonendemicity for Chagas disease like Europe or Asia because the southern states have enzootic *T. cruzi* transmission that involves triatomine species and hosts such as raccoons, opossums, and domestic dogs. Even though, this disease has been considered as a *super-neglected* from the big Pharma Industry viewpoint since the only available drugs for its treatment were introduced in the market more than forty years ago and worsen is that they have low efficacy and cause various severe side effects.

Although the current clinical scenario is of course discouraging and is far from being even a soothing treatment for those who suffer from the disease, it prompts one to set efforts towards the need of discovering and developing new efficacious and safe drugs to treat Chagas disease.

Our research group covers the concept of enzymes acting as targets for the action of drugs. Once *T. cruzi* has many druggable targets, the dihydroorotate dehydrogenase enzyme (TcDHODH) that belongs to the *de novo* pyrimidine nucleotide synthetic pathway has been chosen for the search of new inhibitors that may be of use in the treatment of Chagas disease. To accomplish with this and considering that inhibitors are molecules that decrease enzyme activity leading to parasite death, we used the concepts and tools of modern computational medicinal chemistry such as *in silico* screening of small molecules that bind to the active site of the TcDHODH.

After a thoroughly program of virtually screening thousands of compounds, 26 were purchased from commercially available sources and experimentally assayed against the TcDHODH using Isothermal Titration Calorimetry (ITC) in order to determine the mechanism of inhibition and the kinetic affinity constant (K_i^{app}).

The first series of inhibitors selected from our *in silico* strategy were evaluated by ITC to yield compounds that inhibited the TcDHODH in the micromolar concentration range with an average of 0.50 kcal mol⁻¹ atom⁻¹ ligand efficiency (LE). Because the assayed compounds have low molecular weight (ca. 200 kDa) and high LE, which bring them to the specific bimolecular pattern recognition all of them were

considered good inhibitors capable of being selected to enter the hit-to-lead optimization process.

The detailed description of the ligand-enzyme mode of binding (MOB) is thoroughly accomplished by solving the X ray crystal structure of the surrogate *Leishmania major* DHODH enzyme (LmDHODH), which has a high degree of similarity with the enzyme TcDHODH. The MOB credited to be in the active site of the TcDHODH orthogonally validated the ITC kinetic experimental data obtained for all ligands as competitive inhibitors that interact at the active site of the TcDHODH and helped to generate pharmacophoric hypotheses for the search of new second generation molecules acting against the enzyme TcDHODH. Analyzing the 3D structure of the TcDHODH along with its surrogate LmDHODH, we envisaged the possibility of compounds to extend their side chain beyond the region of the catalytic site (called S1), and interacting in a region called S2, so to increase binding affinity. Moreover, the TcDHODH S2 site that is not found in the 3D protein structure of humans (HsDHODH) is likely to offer new insights for the search of inhibitors whose binding to this S2 site can pave the roads towards the needed structural basis for selective inhibition of TcDHODH.

The most potent compounds inhibited the enzyme competitively with respect to the substrate dihydroorotate (DHO) at K_i^{app} values of 121 ± 14 nM and 190 ± 10 nM, which constitutes high affinity TcDHODH inhibitors. The ITC technique was pivotal to this process of enzyme inhibitors discovery, because it proved to be extremely sensitive thus allowing to monitor the kinetics of the reaction and to obtain precise and accurate values of affinity constants.

The hit rate obtained in this work, considering only those compounds with $K_i^{app} < 100$ μ M, was 46%. This is a really high number, since literature values range from 1 to 10% when the planning new inhibitors via *in silico* methods when compared to the success rates obtained by the methods of testing on large scales (HTS), 0-2 %, the results achieved in this work are even more significant. Moreover, the compounds selected through the integration of *in silico* and calorimetric methods showed a high degree of complexity in the process of bimolecular enzyme-ligand recognition, which allows to pass them to the next phase of the drug design process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Aspectos gerais da história da doença de Chagas. Figura adaptada.	24
Figura 1.2. Distribuição geográfica da doença de Chagas.	25
Figura 1.3. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 1.4. Representação das estruturas químicas dos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.	28
Figura 2.1. Classificação das DHODHs conforme sua estrutura, localização celular, substrato e estado de oligomerização.	37
Figura 2.2. Posicionamento do DHO e do FMN dentro do sítio ativo da TcDHODH.....	39
Figura 2.3. Estruturas tridimensionais de DHODHs pertencentes às classes 1 e 2. (a) L1DHODHA e (b) HsDHODH. Ambas as proteínas enovelam-se um motivo do tipo barril α/β . A TcDHODH é dimérica enquanto HsDHODH é monomérica.	40
Figura 2.4. Reação de óxido-redução catalisada pela enzima TcDHODH.	41
Figura 2.5. Mecanismo da reação catalisada pela enzima TcDHODH. (1) Primeira semi-reação: DHO é convertido a ORO através da abstração do próton (H_{5a}) pela Cys130 e a transferência do hidreto (H_6) ao nitrogênio N_5 do FMN. (2) Segunda semi-reação: a transferência de um hidreto (H) pelo FMN aniônico e de um próton pela Cys130 ao agente oxidante (FUM).	42
Figura 2.6. Estrutura dos inibidores das DHODHs. (a) Fármaco <i>Leflunomida</i> , que tem como alvo a enzima de humanos, utilizado no tratamento de artrite reumatóide; (b) Substâncias 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato são inibidores da Classe 1.	43
Figura 2.7. Reação da enzima GAPDH: fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicetato (1,3-BPG).....	44
Figura 2.8. Estrutura da enzima GAPDH. Domínio do cofator NAD^+ (laranja) e catalítico (azul). Figura gerada com o programa UCSF Chimera	44
Figura 3.1. Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.	50
Figura 3.2. Estratégia de ensaio virtual para seleção de moléculas bioativos.	57
Figura 5.1. Representação geral da docagem.	63

Figura 5.2. Esquema geral para a busca de inibidores da enzima TcDHODH.....	64
Figura 5.3. Alinhamento entre as sequências primárias dos monômeros das enzimas TcDHODH (2E6F) e HsDHODH (2FPV). Em amarelo a região da HsDHODH responsável pela interação com membrana celular.	66
Figura 5.4. Estrutura da a) HsDHODH e b) TcDHODH.	67
Figura 5.5. Mapa de interações do complexo (a) oxonato-TcDHODH (2E6F) e (b) orotato-HsDHODH (2FPV).....	68
Figura 5.6. Estruturas 3D das DHODHs geradas pelo programa <i>SiteID</i> . As esferas definem as cavidades para as enzimas; a) TcDHODH: S1 (sítio catalítico, Bege), S2 (Azul), S3 (Verde), S4 (Rosa) e S5 (Amarelo); b) HsDHODH: S1' (sítio catalítico, Bege) e S3' (verde).....	69
Figura 5.7. Orotato, substância utilizada como referência na busca de novas moléculas.	70
Figura 5.8. Posições relativas dos sítios na enzima TcDHODH. Molécula de orotato em S1, usada como referência na busca de novos inibidores. As linhas pontilhadas indicam as regiões não-expostas ao solvente. A alça ativa está indicada em vermelho.	71
Figura 5.9. Substâncias da primeira geração selecionados para os ensaios contra a TcDHODH.	72
Figura 5.10. Substâncias da segunda geração selecionados para os ensaios contra a TcDHODH.	73
Figura 6.1. Estrutura molecular de um plasmídeo típico usado em clonagem molecular; representado o gene de resistência (A), a região de múltiplos sítios de clonagem (MSC) e a origem de replicação (O).....	77
Figura 6.2. Gel de eletroforese: 1) Banda o marcador de peso molecular, 2) banda do plasmídeo linearizado pET28A com 1600 pares de base e a 3) banda do gene da TcGAPDH, 1077 pares de base.....	81
Figura 6.3. Gel de eletroforese: 1) Banda do marcador de peso molecular; 2-7) Banda o gene da TcGAPDH com o plasmídeo PET28A, com aproximadamente 2700 pares de base.	82
Figura 7.1. Velocidade da reação versus a concentração do substrato para uma reação catalisada por uma enzima. Curva hipérbole retangular e obedece a equação de Michaelis-Menten.	88

Figura 7.2. Esquema representativo de um Calorímetro de Titulação Isotérmica (ITC): (a) Cella de referência e de amostra; (b) Durante o experimento, quando inicia-se a injeção, ocorre uma variação na temperatura da cela de amostra. A diferença de temperatura entre as celas (ΔT) é compensada pelo equipamento, gerando assim um termograma.	89
Figura 7.3. Curva típica de cinética enzimática no ITC: potência térmica versus o tempo. A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior (em destaque, amarelo) e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação.	91
Figura 7.4. Determinação do ΔH_{app} de reação. Curva típica de processo exotérmico. A curva em azul refere-se à determinação do calor de diluição do DHO.....	97
Figura 7.5. Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima TcDHODH para determinar as constantes cinéticas do FUM. a) Curva gerada pelo ITC da troca de calor da reação (mcal) em função do tempo (s). b) Substrato FUM $K_M = 120 \pm 9,0 \text{ mM}$ e $V_{max} = 6,7 \pm 0,1 \mu\text{M s}^{-1}$. Parâmetros gerados a partir da média de três medidas independentes.....	99
Figura 7.6. Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima TcDHODH para determinar as constantes cinéticas do DHO. a) Curva gerada pelo ITC da troca de calor da reação (mcal) em função do tempo (s). b) Substrato DHO $K_M = 8,56 \pm 2,6 \text{ mM}$ e $V_{max} = 4,1 \pm 0,7 \mu\text{M s}^{-1}$. Parâmetros gerados a partir da média de três medidas independentes.....	100
Figura 7.7. Ensaios cinéticos na presença do inibidor. O experimento controle é mostrado na curva em preto. (a) Substrato DHO. Variação de ORO na cela: 5, 10, 20, 30 e 50 μM . $K_i^{app} = 72,21 \pm 7,41 \mu\text{M}$ (b) Substrato FUM. Variação da concentração do ORO na cela: 20, 50, 100, 200 e 300 μM . $K_i^{app} = 110 \pm 6,6 \mu\text{M}$	104
Figura 7.8. Ensaio cinético para a determinação do mecanismo Ping-Pong. Pseudo-primeira ordem com relação ao substrato DHO com diferentes concentrações do FUM.....	105
Figura 7.9. Representações bidimensionais das interações das estruturas dos co-cristais da enzima TcDHODH e os substratos: a) DHO e b) FUM.....	108
Figura 7.10. Reação catalisada pela enzima TcDHODH para os substratos DHO e FUM.....	109
Figura 7.11. Determinação do ΔH_{app} de reação catalisada pela enzima LmDHODH. $\Delta H_{app} = 11,01 \pm 0,01 \text{ kcal mol}^{-1}$	110
Figura 7.12. Curva cinética para a His ₆ -TcGAPDH. a) Substrato NAD ⁺ : $K_M = 272 \pm 25 \mu\text{M}$ e $V_{max} = 3,2 \pm 0,4 \mu\text{M s}^{-1}$. (b) Substrato G3P: $K_M = 352 \pm 21 \mu\text{M}$ e $V_{max} = 6,4 \pm 0,3 \mu\text{M s}^{-1}$	112

Figura 8.1. (a) Representação esquemática da inibição competitiva; (b) Gráfico da variação da velocidade de reação na presença de um inibidor competitivo.	117
Figura 8.2. (a) Representação esquemática da inibição não-competitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor não-competitivo...	118
Figura 8.3. (a) Representação esquemática da inibição incompetitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor incompetitivo.....	119
Figura 8.4. Curvas de Michaelis-Menten dos ensaios de inibição. As curvas controle de cada experimento são apresentadas junto com as curvas de inibição. A concentração dos inibidores variou de 25 μM a 70 μM . Todos os inibidores foram adicionados à cela de amostra junto à enzima.	124
Figura 8.5. As cinco substâncias mais potentes contra a TcDHODH. As melhores posições para as substituições moleculares são na posição C5, para alcançar S2.	125
Figura 8.6. Alinhamento da TcDHODH e LmDHODH. Aminoácidos que pertencem ao sítio S1 e S2 estão marcados com estrelas. Alinhamento gerado com <i>Multialign</i>	127
Figura 8.7. Mapa de interação 3D e 2D dos substâncias (a) 4 e (b) 5 com os sítios S1/S2 da LmDHODH. Figura gerada com programa <i>USCF Chimera</i>	128
Figura 8.8. Evolução do ligante a substância-matriz partindo de diferentes espaços químicos.	132
Figura 8.9. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição competitivo contra a enzima TcDHODH. As estruturas químicas das moléculas também estão representadas. Curva em preto: experimento controle ($I = 0$); Curva em branco: concentração do inibidor é igual a 100 μM	135
Figura 8.10. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para a molécula com maior afinidade contra a TcDHODH. A estrutura química da substância também está representada. $I = 0$: experimento controle; a concentração do inibidor variou de 0,1, 0,5 e 0,05 μM	136
Figura 8.11. Estrutura das substâncias inativas.....	136
Figura 8.12. Esquema do equilíbrio de uma reação enzimática na presença e ausência de um inibidor competitivo.	139
Figura 8.13. Representação esquemática da inibição competitiva.	139

Figura 8.14. Otimização das substâncias da primeira geração (molécula **1**) para os da segunda geração (molécula **20**). 140

Figura 8.15. Representação do inibidor **20** no sítio da TcDHODH gerado após a docagem molecular; (a) Representação 2D das interações, em amarelo a representação das interações hidrofóbicas com os resíduos Leu71, Leu101, Thr46; em verde estão representadas as interações por doação de ligação de hidrogênio do inibidor com os resíduos Asn 67, Asn194; em vermelho a interação por aceitação de ligação de hidrogênio com os resíduos: Asn 67, Ser 195, Asn 194 e Asn 127; (b) Representação 3D das interações, na qual o inibidor **20** está localizado no sítio S2 e os aminoácidos Leu71, Leu 10, Thr 46 (em amarelo e azul) formam esta região..... 141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Enzimas envolvidas no controle da glicólise. Inibição leva a uma redução de 50% fluxo glicolítico.	30
Tabela 5.1. Código PDB do modelo, parâmetros estruturais e ligantes complexados.....	65
Tabela 7.1. Comparação dos valores de K_M para a Classe 1A	101
Tabela 7.2. Entalpia de reação (ΔH_{app}), constante de Michaelis (K_M), velocidade máxima (V_{max}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) para pseudo-primeira ordem com relação ao substrato FUM .	103
Tabela 7.3. Parâmetros termodinâmicos de ativação para a reação catalisada pela enzima TcDHODH.....	107
Tabela 7.4. Purificação da His ₆ -TcGAPDH.....	111
Tabela 8.1. Substância da primeira geração testados contra a TcDHODH.....	123
Tabela 8.2. Parâmetros cristalográficos obtidos para as estruturas dos complexos das substâncias 4 e 5 com a enzima LmDHODH.....	128
Tabela 8.3. Comparação dos valores de K_i^{app} da LmDHODH e TcDHODH.	129
Tabela 8.4. Valores para o K_M , V_{max} , K_i^{app} , número de átomos pesados (HAC), eficiência do ligante (LE) das moléculas testadas, como representadas nas Figuras 8.9, 8.10 e 8.11.....	137
Tabela 8.5. Parâmetros estatísticos dos ajustes das representadas nas Figuras 8.9, 8.10 e 8.11 com os valores de K_i^{app} (em μM) das substâncias testadas contra a TcDHODH	138
Tabela 8.6. Valores para a eficiência do ligante (LE) e K_i^{app} dos inibidores da TcDHODH.	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Átomo
Å	Angstroms
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
Asn	Resíduo de aminoácido asparagina
Asp	Resíduo de aminoácido aspartato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BamHI	Enzima de restrição derivada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Cys	Resíduo de aminoácido cisteína
DCIP	Dicloroindofenol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DHO	Diidroorotato
DHODHs	Diidroorotato desidrogenases
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O _{600nm}	Densidade óptica medida em 600nm
DG	Varição da energia livre de Gibbs
DS	Varição de entropia
DQ	Varição da quantidade de calor
DH _{app}	Varição da entalpia aparente de interação
DH ¹	Varição de entalpia de ativação, no estado de transição
DS ¹	Varição da entropia de ativação, no estado de transição

DG ¹	Variação da energia livre de ativação, no estado de transição
[DL]	Variação na concentração do ligante
E	Enzima
E _a	Energia de ativação
[E _o]	Concentração total de enzima
E.C.	Classificação numérica de enzimas do <i>Enzyme Commission</i>
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EI	Enzima-inibidor
EIS	Enzima-inibidor-substrato
ES	Enzima-substrato
FDA	Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (<i>Food and Drug Administration</i>)
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMN	Flavina mononucleotídeo
FUM	Substrato fumarato
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gln	Resíduo de aminoácido glutamina
Glu	Resíduo de aminoácido glutamato
Gly	Resíduo de aminoácido glicina
His	Resíduo de aminoácido histidina
His ₆ -TcGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase com cauda de histidina

HTS	Ensaio Automatizado em Larga Escala
HsDHODH	Enzima diidroorotato desidrogenase humana
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
ITC	Calorimetria de Titulação Isotérmica
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
kDa	1000 Daltons
K_i^{app}	Constante de inibição aparente
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}	Constante catalítica
LBDD	<i>Ligand Based Drug Design</i> (Planejamento baseado na estrutura do ligante)
LB Broth	Luria Broth
Lys	Resíduo de aminoácido lisina
MW	Massa molecular
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NCE	Nova Entidade Química
PDB	Banco de Dados de Proteínas
QSAR	Relação quantitativa estrutura-atividade
SAR	Relação estrutura-atividade
Ser	Resíduo de aminoácido serina
SBDD	<i>Structure Based Drug Design</i> (Planejamento baseado na estrutura do Alvo)
SDS-Page	Gel de eletroforese de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio

<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEA	Trietanolamina
LmDHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Leishmania major</i>
Ni-NTA	Resina de Níquel iônico imobilizado covalentemente com ácido nitriloacético sobre resina de agarose
ON	<i>Over Night</i> . Período de 12 horas
Triz	Trizma Base
Thr	Resíduo de aminoácido treonina
UMP	Uridina monofosfato
USP	Universidade de São Paulo
V_{\max}	Velocidade máxima
v/v	Proporção volume/volume da mistura de dois componentes da solução
OMS	Organização Mundial da Saúde

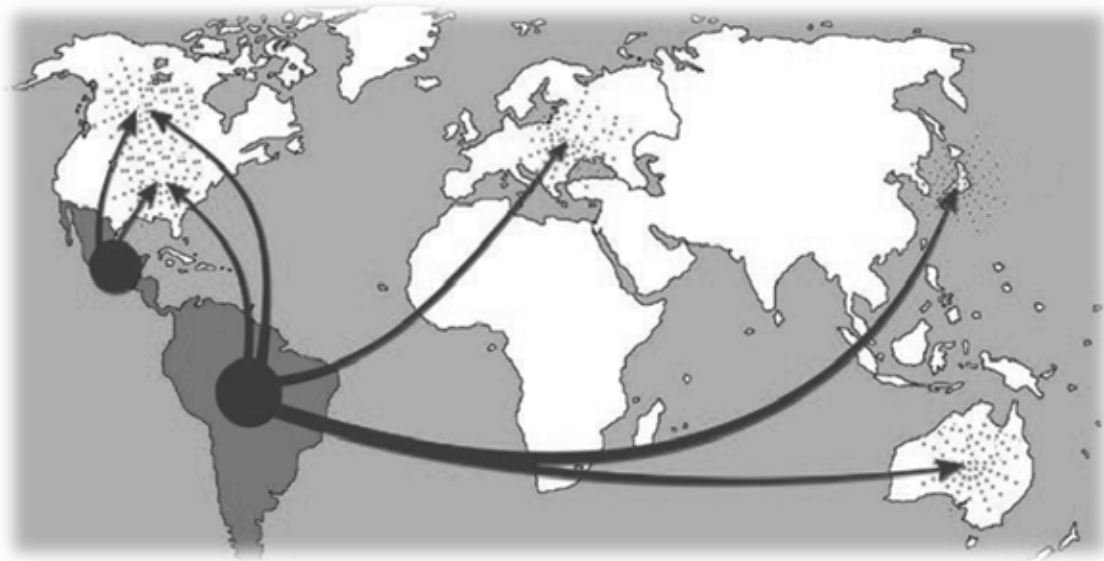
Conteúdo

Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1.1. Doença de Chagas	23
1.1.1. <i>História da doença e distribuição geográfica</i>	23
1.1.2. <i>Manifestações clínicas</i>	25
1.1.3. <i>Tratamento</i>	27
1.2. Via Glicolítica	30
1.3. Via de síntese <i>de novo</i> de pirimidinas	31
1.4. Referências	32
Capítulo 2	36
Alvos enzimáticos.....	36
2.1. Enzima Diidroorotato desidrogenase	37
2.1.1. <i>Localização e estrutura</i>	37
2.1.2. <i>Reação e mecanismo</i>	40
2.1.3. <i>Inibidores</i>	43
2.2. Enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	44
2.3. Referências	45
Capítulo 3	48
Planejamento de fármacos.....	48
3.1. Descoberta de fármacos	49
3.2. As três principais fases da ação de um fármaco	51
3.3. A quiminformática na identificação de fármacos	53
3.3.1. <i>O espaço químico-biológico</i>	55
3.3.2. <i>Ensaio virtual</i>	56
3.4. Referências	58
Capítulo 4	59
Objetivos	59
Capítulo 5	61
Planejamento de inibidores da enzima DHODH de <i>T. cruzi</i>	61
5.1. Identificação e seleção das moléculas	62
5.1.1. <i>Docagem molecular</i>	62
5.2. Resultados e Discussões	64

5.2.1.	<i>Análise das estruturas das DHODHs</i>	64
5.2.2.	<i>Cavidades passíveis de acomodar ligantes</i>	68
5.2.3.	<i>Cavidade escolhida para o planejamento de inibidores enzimáticos</i>	70
5.2.4.	<i>Substâncias selecionados para os ensaios enzimáticos</i>	71
5.2.4.1.	<i>Moléculas da primeira geração</i>	71
5.2.4.2.	<i>Moléculas da segunda geração</i>	72
5.3.	Referências	74
Capítulo 6		75
Biologia Molecular: ferramenta para obtenção do alvo biológico		75
6.1.	DNA e Clonagem Molecular	76
6.2.	Materiais	77
6.3.	Procedimentos experimentais	78
6.3.1.	<i>Produção heteróloga da enzima DHODH de Trypanosoma cruzi</i>	78
6.3.2.	<i>Produção heteróloga da enzima GAPDH de Trypanosoma cruzi</i>	79
6.3.2.1.	<i>Mudança de Plasmídeo de Expressão da enzima GAPDH</i>	79
6.3.2.2.	<i>Expressão e Purificação da enzima GAPDH</i>	82
6.4.	Referências	84
Capítulo 7		85
TcDHODH: Ensaio cinético e mecanismo de reação		85
7.1.	Catálise Enzimática	86
7.2.	Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)	88
7.2.1.	<i>Calorimetria no estudo da cinética enzimática</i>	88
7.3.	Materiais	92
7.3.1.	<i>Ensaio cinético da TcDHODH</i>	92
7.3.2.	<i>Ensaio cinético da His₆-GAPDH</i>	93
7.4.	Procedimento Experimental	93
7.4.1.	<i>Determinação da entalpia aparente da reação catalisada pela enzima DHODH94</i>	
7.4.2.	<i>Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima TcDHODH</i>	94
7.4.3.	<i>Cinética da enzima TcDHODH pelo método Espectrofotométrico UV-VIS</i>	95
7.4.4.	<i>Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Ativação da enzima TcDHODH</i>	95
7.4.5.	<i>Verificação da atividade enzimática utilizando cossolventes</i>	95
7.4.6.	<i>Cinética da enzima LmDHODH por ITC</i>	96
7.4.7.	<i>Cinética da enzima TcGAPDH pelo método Espectrofotométrico UV-VIS</i>	96
7.4.8.	<i>Análise dos dados</i>	96

7.5. Resultados e Discussões	97
7.5.1. <i>Determinação da entalpia aparente da reação para a enzima TcDHODH</i>	97
7.5.2. <i>Determinação dos parâmetros cinéticos para a enzima TcDHODH</i>	99
7.5.3. <i>Determinação dos parâmetros cinéticos para a enzima TcDHODH na presença do cossolvente DMSO e Triton X-100</i>	101
7.5.4. <i>Determinação da inibição pelo produto de reação para a enzima TcDHODH</i> ..	103
7.5.5. <i>Estudo do mecanismo de reação e dos parâmetros termodinâmicos de ativação da enzima TcDHODH</i>	104
7.5.6. <i>Entalpia de reação e parâmetros cinéticos da enzima LmDHODH</i>	110
7.5.7. <i>Cinética da enzima His₆-TcGAPDH por UV-Vis</i>	110
7.6. Referência	113
Capítulo 8	115
Inibidores das DHODHs:	115
8.1. Inibição enzimática	116
8.2. Inibidores reversíveis	116
8.2.1. <i>Inibição Competitiva</i>	116
8.2.2. <i>Inibição Não-competitiva</i>	117
8.2.3. <i>Inibição Incompetitiva</i>	118
8.3. Materiais	120
8.4. Procedimento Experimental	120
8.4.1. <i>Estudos da inibição enzimática</i>	120
8.5. Resultados e Discussões	121
8.5.1. <i>Estudos da inibição enzimática</i>	121
8.5.2. <i>Substâncias ativas</i>	122
8.5.2.1. <i>Primeira geração das substâncias ativas</i>	122
8.5.2.2. <i>Eficiência do ligante</i>	130
8.5.2.3. <i>Segunda geração das substâncias ativas</i>	133
8.6. Referências	144
Capítulo 9	146
Conclusões e Perspectivas	146
9.1. Conclusões	147
9.2. Perspectivas	150

Introdução



O cenário mundial de pessoas infectadas com doença de Chagas, infelizmente, continua crescendo. Neste capítulo são abordados aspectos históricos da doença de Chagas, modo de transmissão, infecção e perspectivas de tratamento, assim como o papel das enzimas da via de síntese de nucleotídeos de pirimidina e da via glicolítica na busca por novos fármacos para o tratamento desta doença.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas

1.1.1. História da doença e distribuição geográfica

Os protozoários, causadores de inúmeras doenças humanas, existiam primariamente no ciclo silvestre, zoótica (sem a participação do homem no ciclo de vida) de ambientes florestais, desde milhões de anos atrás.

Entre as doenças causadas por protozoário, estão a amebíase ou disenteria amebiana, a úlcera de Bauru, toxoplasmose, doença do sono, giardíase, malária, leishmaniose e doença de Chagas. Não se sabe bem ao certo em que período da história o ciclo silvestre de transmissão destes protozoários passou a ser um ‘problema’ no meio humano. Há, por exemplo, relatos de múmias encontradas no Chile e Peru, com sinais de infecção da doença de Chagas, que datam em 7000 AC a 1500 DC (Figura 1.1).

A tripanossomíase americana, mais conhecida como doença de Chagas, foi descrita pela primeira vez pelo médico sanitário Carlos Chagas em 1909.^[1,2] A doença de Chagas é causada pela infecção do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* que pertence à ordem Kinetoplastida. Esta ordem inclui o gênero *Leishmania* (causador da Leishmaniose)^[3] e *Trypanosoma*, que também engloba o agente etiológico da doença do sono, o *Trypanosoma brucei*.^[4,5] Na África, o *T. brucei* é o^[6] causador de altas taxas de morbidez e mortalidade. A organização mundial de saúde (OMS) estima que existam 300.000 pessoas infectadas e que 60 milhões estejam vivendo em áreas de risco^[7].

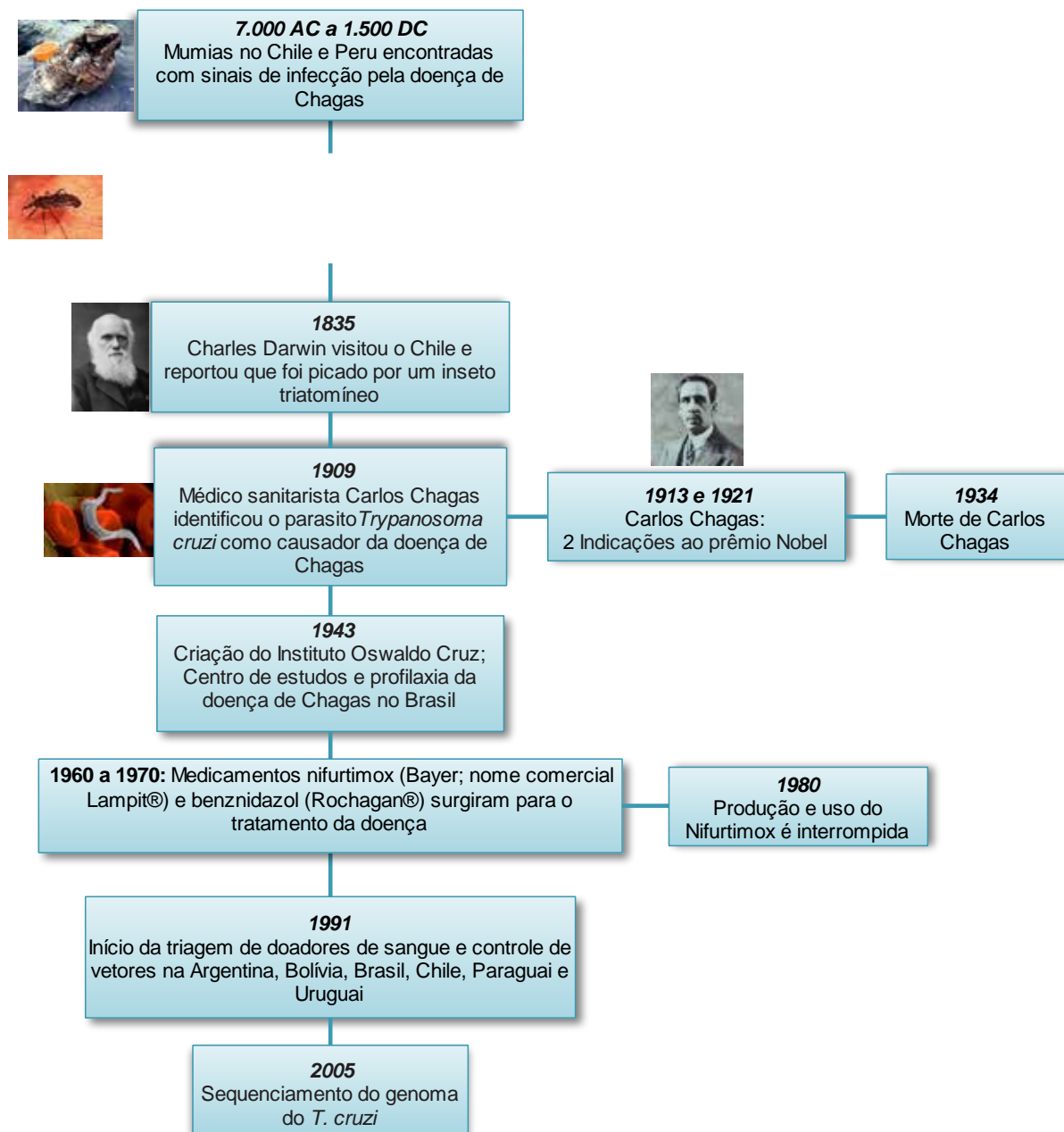


Figura 1.1. Aspectos gerais da história da doença de Chagas. Figura adaptada.^[8]

No Brasil existem atualmente seis espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença humana. A leishmaniose visceral (também conhecida como febre negra ou kala-azar na Índia) ^[9,10] é a mais severa, sua transmissão ocorre através do chamado “mosquito da areia”, afetando mais de 12 milhões de pessoas com cerca de 350 milhões em áreas de risco. ^[10] Esta doença acomete principalmente pessoas que vivem em países pobres, se estendendo no continente Americano, Africano e Asiático. Infelizmente,

ainda não existe um tratamento efetivo para o tratamento da leishmaniose e a sua quimioterapia é ineficiente.

Entretanto, desses males, a Doença de Chagas é endêmica em países latino-americanos. ^[11] Porém, devido à crescente emigração de pessoas infectadas para áreas não endêmicas, já são encontrados casos em países como os Estados Unidos (mais de 300.000 pessoas infectadas), Canadá (mais de 5.500 pessoas infectadas) e Austrália (mais de 1.500 pessoas infectadas), Japão (mais de 3.000 pessoas infectadas) e no continente Europeu (mais de 80.000 pessoas infectadas). ^[12]



Figura 1.2. Distribuição geográfica da doença de Chagas. Figura adaptada. ^[12]

1.1.2. Manifestações clínicas

A doença de Chagas apresenta duas fases distintas: a fase aguda e a crônica. A primeira leva a sintomas de febre, anorexia, dilatação do fígado e do baço, inflamações do miocárdio e em casos raros pode levar ao desenvolvimento da meningoencefalite, que é fatal. Esta fase ocorre logo após a infecção pelo parasito. A fase crônica permanece assintomática no período de dez a vinte anos. No entanto, nesta etapa, o parasito se reproduz continuamente no organismo, causando danos irreversíveis em

órgãos como o cérebro e o coração. Após uma ou duas décadas de progressão da doença, há o aparecimento gradual de demência (3% dos casos iniciais), insuficiência cardíaca (em 30% dos casos), dilatação do trato digestivo (megaesôfago ou megacólon, em 6% dos casos) devido à destruição da enervação e das células musculares destes órgãos, as quais são responsáveis pelo tônus muscular. Neste estágio a doença é geralmente fatal. ^[13]

1.1.1. Contaminação e ciclo de vida

A contaminação do homem por meio do inseto vetor ocorre quando o inseto, ao picar a vítima para sugar o sangue, defeca sobre a pele, que então coça o local e assim transfere o parasito para a corrente sanguínea. Outras formas de contaminação são por transfusão sanguínea, via congênita, acidentes de laboratórios, transplante de órgãos e ingestão oral do parasito por alimentos contaminados. ^[1-8] Uma vez dentro da célula do hospedeiro, as formas *tripomastigotas* transformam-se na forma replicativa em humanos, a *amastigota*, que se reproduzem várias vezes antes de voltar à forma *tripomastigota* e serem liberada para as correntes sanguínea e linfática após o rompimento da membrana celular. Uma vez que isto ocorre, o parasito se espalha pelo organismo invadindo novas células e repetindo o processo de replicação (Figura 1.3). ^[14] Enquanto se espalha pelo corpo, carregado pelo sangue, o parasito também fica disponível para transferência ao inseto vetor através da picada e assim seguir novamente seu ciclo no triatomíneo. ^[15]

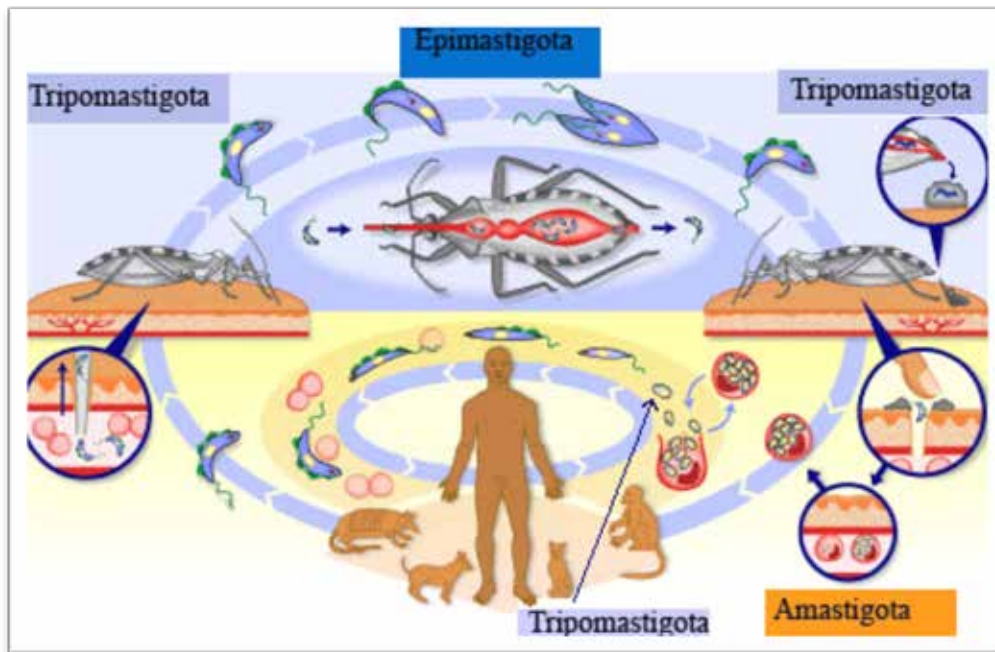


Figura 1.3. Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.^[14]

1.1.3. Tratamento

Doenças como a malária, leishmaniose, doença do sono e a doença de Chagas são denominadas como *doenças tropicais negligenciadas*. Apesar de resultarem em elevadas taxas de mortalidade e consequências sociais e econômicas devastadoras, são largamente negligenciadas pela indústria farmacêutica porque afetam principalmente pessoas pobres nos países tropicais. Desse modo, elas são vistas como um mercado pouco atraente para impulsionar investimentos no desenvolvimento de novos fármacos^[16]. Esse termo é apropriado já que dos mais de 1300 fármacos introduzidos para várias indicações terapêuticas entre os anos de 1975 e 1999, somente 13 tinham como alvo as doenças tropicais. Em 2000, somente 0,1% do investimento global em pesquisas na área de saúde foi destinado para a busca de fármacos contra a malária, leishmaniose, tripanosomíases e tuberculose^[17].

Infelizmente, o descaso com a doença de Chagas é ainda mais grave, ao ponto de alguns autores a descreverem como uma doença tropical *super-negligenciada*^[16-18]. Os

únicos fármacos utilizados tratamento da doença (Figura 1.4) foram introduzidos há mais de 40 anos: nifurtimox (Lampit®) e benzonidazol (Rochagan®). Estes dois fármacos são ativos apenas na fase aguda da doença e, além disso, ambos causam sérios efeitos colaterais tais como anorexia, perda de peso, vômito, náusea, diarreia. O nifurtimox, atualmente, não é mais comercializado no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai. ^[19]

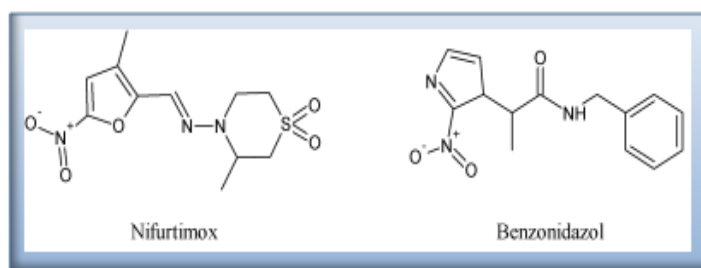


Figura 1.4. Representação das estruturas químicas dos fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.

O mecanismo de ação proposto para o nifurtimox e o benzonidazol é através da formação de radicais livres e/ou metabólitos eletrofílicos ^[20,21]. O grupo nitro de ambos os fármacos é reduzido a um grupo amino pela ação de nitroredutases, com a formação de vários radicais livres intermediários e metabólitos eletrofílicos.

Estes fármacos não respeitam os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, que descreve que um “bom” fármaco tenha (i) cura parasitológica nas fases aguda e crônica de infecção; (ii) seja efetivo em dose única ou em poucas doses; (iii) seja facilmente acessível ao paciente contaminado; (iv) sem efeitos colaterais ou teratogênicos; (v) sem a necessidade de hospitalização para o tratamento e (v) não induza resistência no agente etiológico. ^[22,23]

O *T. cruzi* forma um grupo geneticamente diverso com cepas que variam quanto a taxa de multiplicação e morfologia. As formas tripomastigotas podem invadir uma variedade de células de mamíferos *in vivo* e *in vitro* incluindo fibroblastos, células

epiteliais, células endoteliais e neurônios, mostrando preferência por células do sistema retículo-endotelial e células musculares.

O genoma do *T. cruzi*, sequenciado em 2005, está sendo estudado amplamente e tem sido demonstrada a presença de centenas de genes que codificam proteínas, muitas com atividade enzimática, que participam dos processos metabólicos essenciais para a sobrevivência do parasito. Estas proteínas podem ser utilizadas para o controle quimioterapêutico das infecções parasitárias.

Nas últimas duas décadas, os novos conhecimentos adquiridos a partir do estudo das vias bioquímicas do *T. cruzi* têm permitido a identificação de uma série de alvos para serem usados no tratamento da doença de Chagas. As enzimas glutationil espermidina sintetase^[24], tripanotona sintetase, farnesilpirofosfato sintase, tripanotona redutase^[25], preniltransferases,^[26] hipoxantina-guanina fosforibosil transferase,^[27] cruzaina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e diidroorotato desidrogenase (DHODH) têm sido identificadas como potenciais alvos quimioterapêuticos.^[10-26]

As enzimas cruzaina, GAPDH e DHODH estão entre os alvos biomacromoleculares estudados no Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais (NEQUIMED-PN). Neste trabalho, dois destes alvos foram estudados e serão descritos nos capítulos seguintes: a enzima TcDHODH e GAPDH.

1.2. Via Glicolítica

A via glicolítica é considerada uma rota promissora para o desenvolvimento de fármacos contra os tripanossomatídeos porque exerce um papel essencial no fornecimento de energia para o parasito, na forma de ATP (Adenosina tri-fosfato) e ocorre em uma organela especializada chamada de glicossomo.^[35] No glicossomo estão presentes sete das dez enzimas que participam da conversão da glicose em piruvato: hexocinase (HK), glicose 6-fosfato-isomerase; 6-fosfofrutocinase (PYK), 1,6-difosfato aldolase (ALD), triosefosfato isomerase (TIM), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a fosfoglicerato cinase (PGK).

Os alvos mais promissores para o desenvolvimento de fármacos tripanossomicidas foram identificados por Bakker *et al.*, usando modelos matemáticos para calcular quais as etapas da glicólise precisam ser menos inibidas para induzir a inibição de certa quantidade do fluxo glicolítico^[36]. A Tabela 1.1 reporta a porcentagem em que cada enzima da glicólise precisa ser inibida para que o fluxo glicolítico diminua em 50%. A enzima GAPDH exerce papel significativo no controle do fluxo glicolítico. A inibição dessa enzima em 84% provoca a redução do fluxo glicolítico em 50%.

Tabela 1.1. Enzimas envolvidas no controle da glicólise. Inibição leva a uma redução de 50% do fluxo glicolítico.

Enzimas*	Inibição necessária (%)
Transporte de glicose	51
ALD	76
GDH	83
GAPDH	84
PGK	85
HK	93
PFK	93
PYK	97

*ALD, frutose-1,6-difosfato aldolase; GDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase; GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; PGK, 3-fosfoglicerato cinase; HK, hexocinase; PFK, 6-fosfofruto-cinase; PYK, piruvato cinase

Engel *et al.* mostraram que uma cultura da forma amastigota do *T. cruzi* possui um metabolismo essencialmente glicolítico, e que ela adquire a habilidade de oxidar substratos, tais como aminoácidos, somente após a diferenciação para a forma epimastigota.^[37] A forte dependência dos tripanossomatídeos pela via glicolítica para a obtenção de energia explica o motivo pelo qual as enzimas desta via se tornaram alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas.^[35-41]

1.3. Via de síntese *de novo* de pirimidinas

Diversos microrganismos que afetam a saúde humana como, por exemplo, a bactéria *Helicobacter pylori* (responsável por úlceras estomacais), o parasito *Plasmodium falciparum* (causador da malária) e também tripanossomatídeos como o *Trypanosoma cruzi* só conseguem obter nucleotídeos de pirimidinas através da via de biossíntese *de novo*.^[38] Assim, as enzimas que participam desta via metabólica são consideradas potenciais alvos para o planejamento de fármacos.^[39]

A síntese de nucleotídeos é essencial para o desenvolvimento de todos e quaisquer organismos. Além de participarem como unidades fundamentais dos ácidos nucléicos, DNA e RNA, os nucleotídeos atuam também como ativadores e inibidores de várias vias do metabolismo intermediário das células.

A enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH), que está na quarta etapa da síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina, tem sido estudada como um alvo promissor para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra parasitoses causadas por tripanossomatídeos.^[40,41] Experimentos de nocaute genético (do termo “*knock out*”, que consiste em bloquear a expressão de um gene específico num organismo) visando a validação da DHODH do *T. cruzi* (TcDHODH) sugerem o papel essencial desta enzima para a sobrevivência do parasito.^[38]

Apesar do potencial da enzima DHODH como alvo terapêutico, apenas a enzima de *Plasmodium falciparum* (PfDHODH) têm sido objeto de vários estudos para o planejamento de inibidores capazes de intervir na via metabólica de síntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidinas e atuarem como agentes quimioterápicos contra a Malária.^[42,43] Alguns desses são baseados em fármacos já disponíveis para o tratamento de artrite reumatóide ou imunossupressivos, os quais têm como alvo a enzima DHODH de humanos (HsDHODH).^[44]

1.4. Referências

- [1] 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. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- [2] BARRET, M. P.; BURCHMORE, R. J. S.; STICH, A.; LAZZARI, J. O.; FRASH, A. C.; CAZZULO, J. J.; KRISHNA, S. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, 2003.
- [3] HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- [4] MASLOV, D.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.
- [5] BALAKRISHNAN, I.; ZUMLA, A. African trypanosomiasis. In: GILLESPIE, S. H.; PEARSON, R. D. (Eds.). **Principles and practice of clinical parasitology**. Chichester: John Wiley, 2001. p. 315-334.
- [6] MASLOV, D.; PODLIPAEV, S. A.; LUKES, J. Phylogeny of the kinetoplastida: taxonomic problems and insights into the evolution of parasitism. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 397-402, 2001.
- [7] CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.
- [8] CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nat.**, v. 465, n. n7301_supp, p. S4-S5, 2010.
- [9] MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
- [10] HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.
- [11] CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.
- [12] COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. n7301_supp, p. S6-S7, 2010.
- [13] LINÁRES, G. E.; RAVASCHINO, E. L.; RODRIGUEZ, J. B. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. **Cur. Med. Chem.**, v. 13, n. 3, p. 335-360, 2006.

- [14] Life-cycle of *Trypanosoma cruzi*. Disponível em: <[http:// apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas](http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas) >. Acesso em: 27 jan. 2011.
- [15] COURA, J. R.; VINAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 465, n. n7301_supp, p. S6-S7, 2010.
- [16] MORAN, M.; GUZMAN, J.; ROPARS A. L.; MCDONALD, A.; JAMESON, N.; OMUNE, B.; RYAN, S.; WU, L. Neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Med.**, v. 6, n. 2, p. 137-146, 2009.
- [17] PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M. A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n. 9, p. 727-740, 2005.
- [18] MOREL, C. M.; CARVALHEIRO, J. R.; ROMERO, C. N. P.; COSTA, E. A.; BUSS, P. M. The road to recovery. **Nature Biotech.**, v. 449, n. 7159, p. 180-182, 2007.
- [19] PAULINO, M.; IRIBARNE F.; DUBIN, M.; MORALES, S. A.; TAPIA, O.; STOPPANI, A. O. M. The chemotherapy of chagas' disease: an overview. **Mini-rev. Med. Chem.**, v. 5, n. 5, p. 499-519, 2005.
- [20] MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R.; MASON, R. P.; LEÓN, W.; STOPPANI, A. O. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 218, n. 2, p. 585-591, 1982.
- [21] DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 2, p. 223-238, 1984.
- [22] COURA, J. R. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - A proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, 2009.
- [23] SOEIRO, M. N. C.; DE CASTRO, S. L. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. **Exp. Opin. Therap. Targ.** v. 13, n. 1, p. 105-121, 2009.
- [24] VERBRUGGEN, C.; DE CRAECKER, S.; RAJAN, P.; JIAO, X. Y.; BORLOO, M.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H.; HAEMERS, A. Phosphonic acid and phosphinic acid tripeptides as inhibitors of Glutathionylspermidine synthetase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 6, n. 3, p. 253-258, 1996.
- [25] CUNNINGHAM, M. L.; ZVELEBIL, M. J.; FAIRLAMB, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. **Eur. J. Biochem.**, v. 221, n. 1, p. 285-295, 1994.
- [26] URBINA, J. A.; MORENO, B.; VIERKOTTER, S.; OLDFIELD, E.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; BAILEY, B. N.; YAN, W.; SCOTT, D. A.; MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 47, p. 33609-33615, 1999.
- [27] NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 40, n. 11, p. 2455-2458, 1996.
- [28] WILLSON, M., SANEJOUAND, Y. H., PERIE, J., HANNAERT, V., OPPERDOES, F. R. Sequencing, modeling, and selective inhibition of *Trypanosoma brucei* hexokinase. **Chem. Biol.**, v. 9, n. 7, p. 839-847, 2002.
- [29] CORDEIRO, A. T.; HARDRÉ, R.; MICHELS, P. A. M.; SALMON, L.; DELBONI, L. F.; THIEMANN, O. H. *Leishmania mexicana* glucose-6-phosphate isomerase: crystallization, molecular-replacement solution and inhibition. **Acta Cryst. B.**, v. D60, n. 5, p. 915-919, 2004.

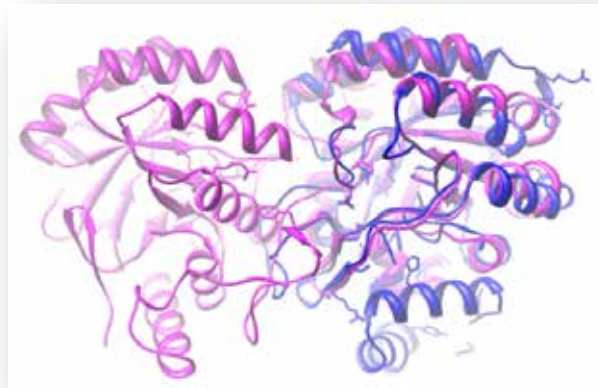
- [30] NYASSE, B.; NONO, J.; SONKE, B.; DENIER, C.; FONTAINE, C. Trypanocidal activity of bergerin, the major constituent of *Flueggea virosa*, on *Trypanosoma brucei*. **Pharmazie**, v. 59, n. 6, p. 492-494, 2004.
- [31] CLAUSTRE, S.; DENNIER, C.; GHAZAL, F. L.; LOUGARE, A.; LOPEZ, C.; CHEVALIER, N.; MICHELS, P. A. M.; PERRIE, J.; WILSON, M. Exploring the active site of *Trypanosoma brucei* phosphofructokinase by inhibition studies: specific irreversible inhibition. **Biochem.**, v. 41, n. 32, p. 10183-10193, 2002.
- [32] DAX, C.; DUFFIEUX, F.; CHABOT, N.; COINCON, M.; SYGUSCH, J.; MICHELS, P. A. M.; BLONSKI, C. Selective irreversible inhibition of fructose 1,6-bisphosphate aldolase from *Trypanosoma brucei*. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 5, p. 1499-14502, 2006.
- [33] ILLANA, V. O.; MONTFORT, R. P.; CALAHORRA, F. L.; COSTAS, M.; ROMERO, A. R.; PUYOU, M. T. G.; PUYOU, A. G. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. **Biochem.**, v. 45, n. 8, p. 2556-2560, 2006.
- [34] BRESSI, J. C.; CHOE, J.; HOUGH, M. T.; BUCKNER, F. S.; VOORHIS, W. C. V.; VERLINDE, C. L. M. J.; HOL, W. G. J.; GELB, M. H., Adenosine analogues as inhibitors of *Trypanosoma brucei* phosphoglycerate kinase: elucidation of a novel binding mode for a 2-amino-N(6)-substituted adenosine. **J. Med. Chem.**, v. 43, n. 22, p. 4135-4150, 2000.
- [35] VERLINDE, C. L. M. J.; HANNAERT, V.; BLONSKI, C.; WILLSON, M.; PÉRIÉ, J. J.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; OPPERDOES, F. R.; GELB, M. H.; HOL, W. G. J.; MICHELS, P. A. M. Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. **Drug Resist. Updates**, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.
- [36] BAKKER, B. M.; MICHELS, P. A. M.; OPPERDOES, F. R.; WESTERHOLFF, H. V. What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*? **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 21, p. 14551-14559, 1999.
- [37] ENGEL, J. C.; CAZZULO, B. M. F.; STOPPANI, A. O. M.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 26, n. 1, p. 1-10, 1987.
- [38] ANNOURA, T.; NARA, T.; MAKIUCHI, T.; HASHIMOTO, T.; AOKI, T. The Origin of Dihydroorotate Dehydrogenase Genes of Kinetoplastids, with Special Reference to Their Biological Significance and Adaptation to Anaerobic, Parasitic Conditions. **J. Mol. Evolution**, v. 60, n. 1, p. 113-127, 2005.
- [39] CHRISTOPHERSON, R. I.; LYONS, S. D.; WILSON, P. K. Inhibitors of de novo nucleotide biosynthesis as drugs. **Acc. Chem. Res.**, v. 35, n. 11, p. 961-971, 2002.
- [40] CORDEIRO, A. T.; FELICIANO, P. R.; NONATO, M. C. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystal. Section F**, v. 62, n. 10, p. 1049-1051, 2006.
- [41] ARAKAKI, T. L.; BUCKNER, F. S.; GILLESPIE, J. R.; MALMQUIST, N. A.; PHILLIPS, M. A.; KALYUZHNIY, O.; LUFT, J. R.; DETITTA, G. T.; VERLINDE, C. L. M. J.; VOORHIS, W. C. V.; HOL, W. G. J.; MERRITT, E. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Mol. Microbiol.**, v. 68, n. 1, p. 37-50, 2008.
- [42] HEIKKILA, T.; RAMSEY, C.; DAVIES, M.; GALTIER, C.; STEAD, A. M. W.; JOHNSON, A. P.; FISHWICK, C. W. G.; BOA, A. N.; MCCONKEY, G. A. Design and synthesis of potent Inhibitors of the malaria parasite dihydroorotate dehydrogenase. **J. Med. Chem.**, v. 50, n. 2, p. 186-191, 2006.

[43] HURT, D. E.; WIDOM, J.; CLARDY, J. Structure of Plasmodium falciparum dihydroorotate dehydrogenase with a bound inhibitor. **Acta Crystal. Section D**, v. 62, n. 3, p. 312-323, 2006.

[44] LIU, S.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiplasmodial agents. **Struct. Fold. Design**, v. 8, p. 25-33, 2000.

Capítulo 2

Alvos enzimáticos



A enzima diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH) e de *Leishmania major* (LmDHODH) são os alvos biomacromoleculares amplamente estudados neste trabalho. Já a contribuição deste trabalho com relação à enzima gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (GAPDH) envolve os aspectos da elaboração e padronização de um novo protocolo de expressão genética, para obtenção da proteína para a realização de ensaios bioquímicos. Nesse contexto, serão apresentadas informações a respeito da via metabólica, reação e o mecanismo destas duas enzimas, assim como da sua estrutura cristalográfica.

2. ALVOS ENZIMÁTICOS

2.1. Enzima Diidroorotato desidrogenase

2.1.1. Localização e estrutura

De acordo com a estrutura primária e localização celular, as enzimas diidroorotato desidrogenases (DHODHs E.C. 1.3.3.1) de diferentes organismos podem ser divididas em duas Classes, 1 e 2.^[1] As enzimas da Classe 1 podem ser subdivididas nas sub Classes 1A, 1B, conforme Figura 2.1.

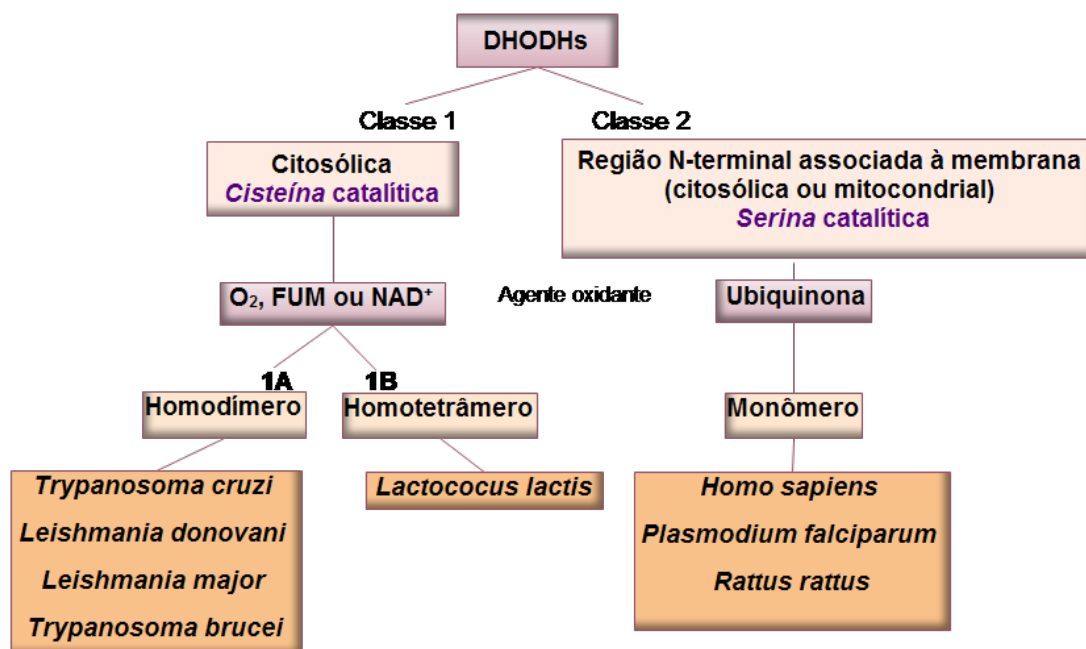


Figura 2.1. Classificação das DHODHs conforme sua estrutura, localização celular, substrato e estado de oligomerização.

Enquanto as proteínas membros das Classes 1 são citosólicas, com massa molecular de aproximadamente 34 kDa, as DHODHs da Classe 2 apresentam uma extensão na região N-terminal que permite a associação dessas enzimas com membranas.^[2] No alinhamento da cadeia de aminoácidos a identidade sequencial entre as enzimas da Classe 1 e 2 é menor que 20%.

Outra diferença entre as duas famílias de enzimas diz respeito ao aceitador natural de elétrons utilizado na reoxidação do cofator flavina mononucleotídeo (FMN). As enzimas da Classe 1 utilizam como receptores de elétrons o oxigênio, fumarato (FUM) ou a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺). Já as enzimas da Classe 2 utilizam moléculas com características mais hidrofóbicas, como a ubiquinona.^[2,3] Nas DHODHs da Classe 1, como resíduo catalítico a cisteína, enquanto que na Classe 2 este resíduo é substituído por uma Serina.^[8]

Uma característica importante das DHODHs da Subclasse 1A é o fato de o sítio catalítico estar enterrado dentro de cada unidade monomérica e encoberto por uma alça bastante flexível composta pelos resíduos 128-135, chamada de *alça ativa* ou *loop β 4- α 4*, que abre e fecha para permitir a entrada dos substratos e saída dos produtos do sítio. Preso nesta cavidade (por interações de ligação de hidrogênio), próximo ao sítio catalítico, encontra-se o grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN), o qual possui graus de liberdade conformacionais bastante restrito devido a interações bastante específicas com o sítio.^[3-5]

A forma planar do anel de oxazolidina do cofator FMN permite o posicionamento paralelo com o anel pirimidínico do substrato diidroorotato (DHO) e do produto de reação, orotato (ORO), sem alterar significativamente a conformação da cadeia polipeptídica que circunda a região do sítio. Na Figura 2.2 é mostrada uma representação desse emparelhamento das moléculas dentro do sítio onde é possível observar que a cisteína catalítica (Cys130) se posiciona paralelamente ao substrato, a qual favorece a retirada dos hidrogênios dos carbonos C₅ e C₆ do substrato DHO e transferência aos carbonos C₂ e C₃ do substrato FUM durante a catálise.^[1-4]

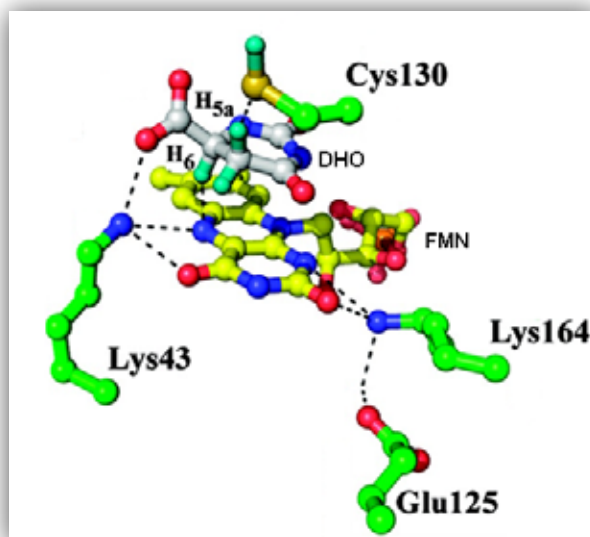


Figura 2.2. Posicionamento do substrato DHO (em cinza) e do FMN (em amarelo) dentro do sítio ativo da TcDHODH.

Várias estruturas cristalográficas de DHODHs pertencentes a diferentes organismos têm sido determinadas através de cristalografia de raios X, como por exemplo (código do Banco de dados de Proteínas, PDB): 2E6F (*Trypanosoma cruzi*), 3C61 (*Leishmania donovani*), 1JUE (*Lactococcus lactis*), 2B4G (*Trypanosoma brucei*), 1EP3 (*Lactococcus lactis*), 2FPV (*Homo sapiens*), 3FJ6 (*Plasmodium falciparum*) e 1UUM (*Rattus rattus*).^[4-8]

Em geral, as enzimas de ambas as classes apresentam uma estrutura terciária similar, enovelando-se em um motivo barril α/β que consiste de uma região central formada por 8 fitas beta paralelas rodeadas por 8 α -hélices (Figura 2.3).

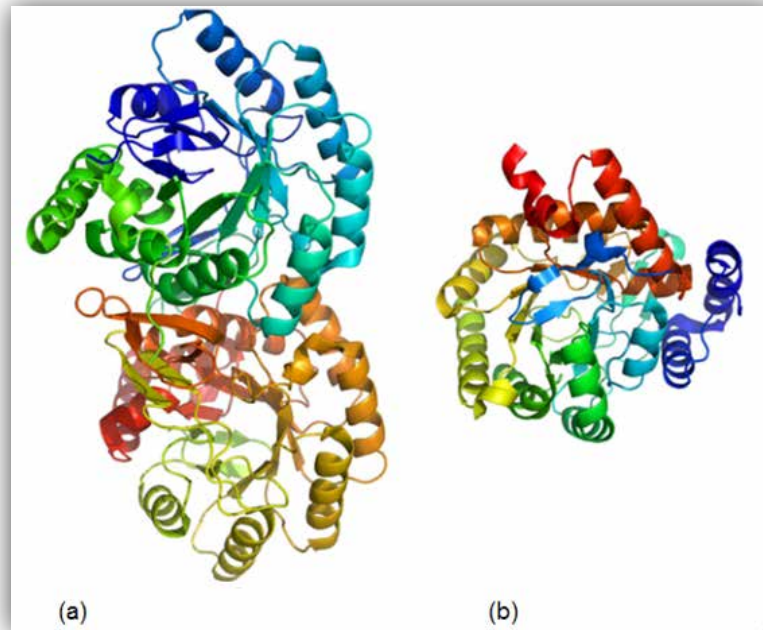


Figura 2.3. Estruturas tridimensionais de DHODHs pertencentes às classes 1 e 2. (a) LmDHODH e (b) HsDHODH. Ambas as proteínas enovelam-se um motivo do tipo barril α/β . A TcDHODH é dimérica enquanto HsDHODH é monomérica.

No topo do barril, três fitas β antiparalelas formam uma espécie de “tampa” que recobre o sítio catalítico. O fundo do barril é formado um par de fitas β antiparalelas. As enzimas pertencentes à Classe 2 contêm na região N-terminal um motivo adicional composto de três hélices, responsável pela interação desta com a membrana, e que se encontra ausente na estrutura de DHODHs da Classe 1. Além disso, DHODHs da Classe 2 apresentam um longa alça que conecta uma das α -hélices do N-terminal ao fundo do barril.

2.1.2. Reação e mecanismo

A biossíntese *de novo* de nucleotídeos de pirimidina é composta de seis enzimas: carbamil fosfato sintetase, aspartato transcarbamilase, diidroorotase, diidroorotato desidrogenase, orotato fosforibosil transferase e orotodilato descarboxilase. O produto resultante de cada reação enzimática é utilizado como substrato pela enzima subsequente da via. ^[10-14]

Durante a catálise, a DHODH utiliza cofator FMN na primeira semi-reação para promover a oxidação do substrato diidroorotato (DHO) enquanto FMN é reduzido. No caso da enzima DHODH de tripanosomatídeos como *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH) e *Leishmania major* (LmDHODH), o fumarato (FUM) é o agente oxidante, Fig. 2.4.^[9] Na segunda semi-reação, FMN é reoxidado através do auxílio do FUM, segundo um mecanismo enzimático do tipo *ping-pong*. Essa é à única etapa de oxido-redução da via.

[10,11]

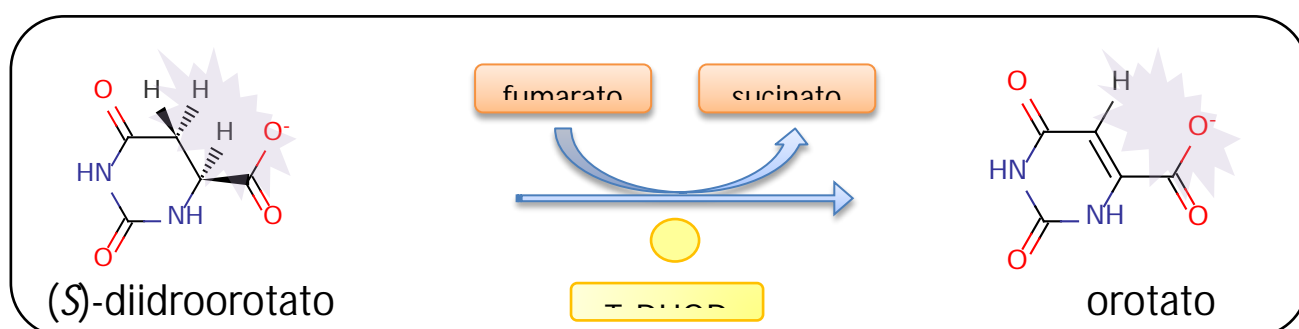


Figura 2.4. Reação de óxido-redução catalisada pela enzima TcDHODH.

Nos últimos anos o mecanismo da reação catalisada pela DHODH tem sido bastante estudado, tanto com base em análises cinéticas quanto estruturais. Sendo que o mecanismo detalhado de toda a reação da TcDHODH foi proposto recente.^[12-22]

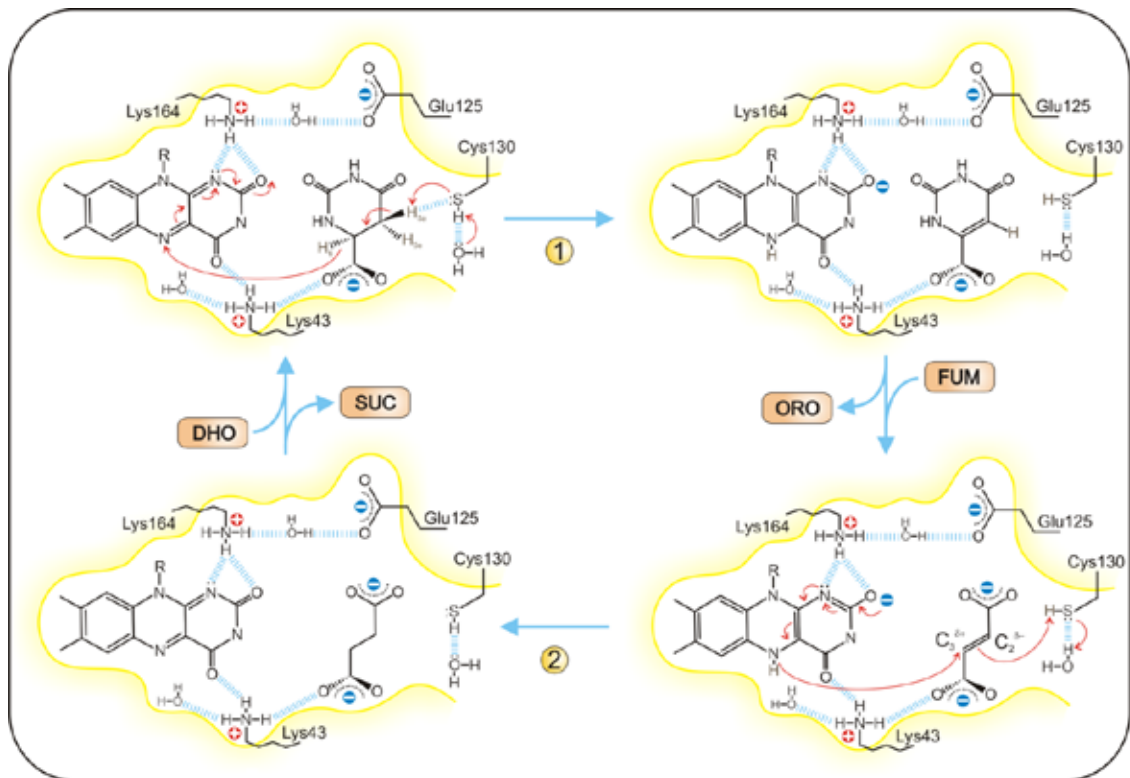


Figura 2.5. Mecanismo da reação catalisada pela enzima TcDHODH. (1) Primeira semi-reação: DHO é convertido a ORO através da abstração do próton (H_{5a}) pela Cys130 e a transferência do hidreto (H_6) ao nitrogênio N_5 do FMN. (2) Segunda semi-reação: a transferência de um hidreto (H^-) pelo FMN aniônico e de um próton pela Cys130 ao agente oxidante (FUM).

A cisteína catalítica (Cys130) abstrai um próton do carbono-5 (C_5) do substrato DHO. Juntamente com a abstração deste próton, o DHO transfere um hidrogênio (H_6) na forma de hidreto, ao nitrogênio N_5 do cofator FMN. Este processo de redução ocorre enquanto a carga negativa do FMN aniônico reduzido (FMNH⁻) é estabilizada pelos resíduos de aminoácidos Lys43 e Lys164. Em seguida o produto da primeira semi-reação orotato (ORO) deixa o sítio ativo para a entrada do agente oxidante fumarato (FUM), Figura 2.5. Na segunda semi-reação, a redução do substrato FUM a SUC, há a transferência de um hidreto ao carbono $C_3^{\delta+}$ do FUM pelo nitrogênio N_5 do FMNH⁻ e de um próton da Cys130 ao carbono $C_2^{\delta-}$. Ao final desta etapa o sítio fica novamente disponível para a entrada de outra molécula de substrato e um novo ciclo da catálise.

2.1.3. Inibidores

Vários inibidores focando o sítio de interação da ubiquinona (substrato das DHODH da Classe 2) têm sido planejados principalmente para a enzima DHODH de humanos. Por exemplo, o pró-fármaco *leflunomida* (com o nome comercial de ARAVA® da Sanofi-Aventis) (a) está disponível para uso clínico para o tratamento de artrite reumatóide, Fig. 2.6. [2]

As substâncias 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato são conhecidas como inibidores da Classe 1 das DHODHs (Figura 2.6 (b)), identificados por Palfey *et al.* e recentemente estudados como inibidores da DHODH de *Lactococcus lactis* através de métodos calorimétricos e espectroscópicos para avaliar o efeito do pH nas suas afinidades pelo alvo. [23,24] Outro inibidor descrito na literatura é o próprio produto de reação, orotato (ORO) e uma molécula muito semelhante, o oxonato (OXO). [12,25] Porém, não há relatos na literatura sobre planejamento ou teste de inibidores da TcDHODH com o objetivo de desenvolvimento de candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Chagas.

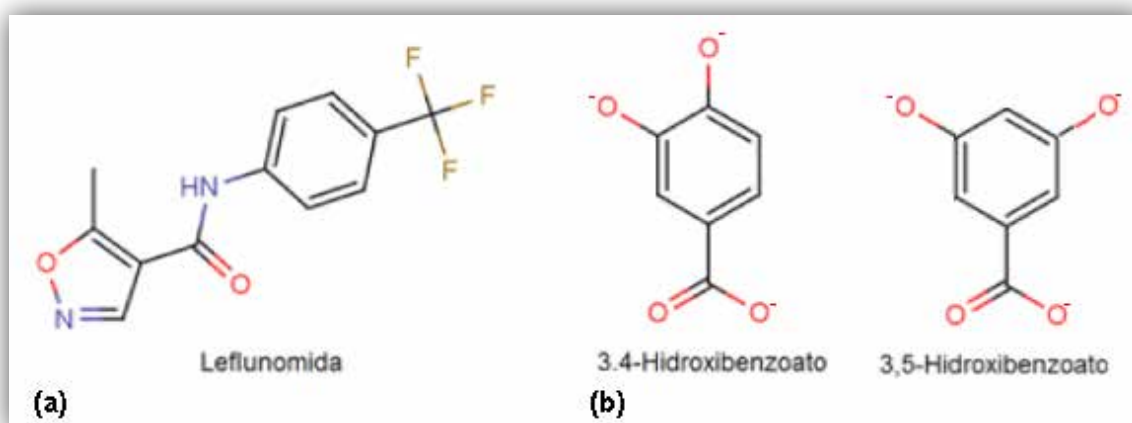


Figura 2.6. Estrutura dos inibidores das DHODHs. (a) Fármaco *leflunomida*, que tem como alvo a enzima de humanos, utilizado no tratamento de artrite reumatóide; (b) Substâncias 3,4- e 3,5-hidroxibenzoato são inibidores da Classe 1.

2.2. Enzima Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

Esta enzima está na sexta reação da glicólise: a fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG) (Figura 2.7).^[26] As formas infectantes de *T. cruzi* (tripomastigotas) são altamente dependentes da via glicolítica para produção de ATP. Estas informações levam a considerar a enzima GAPDH como um alvo atraente para a descoberta e desenvolvimento de novos inibidores enzimáticos como candidatos potenciais a fármacos antichagásicos.

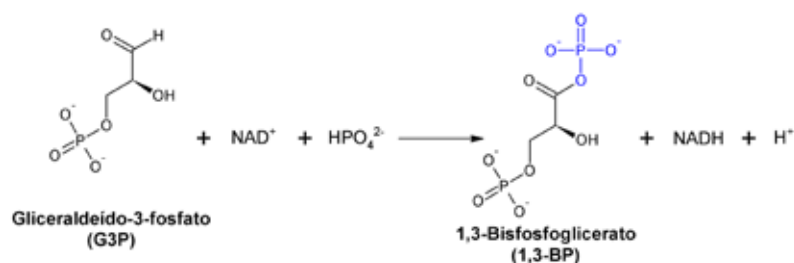


Figura 2.7. Reação da enzima GAPDH: fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) para 1,3-bisfosfoglicetato (1,3-BPG).

A enzima GAPDH consiste de um homotetrâmero com massa molecular de aproximadamente 156 kDa onde cada subunidade do tetrâmero é composta por dois domínios: o domínio de ligação do NAD^+ , na extremidade N-terminal, e o domínio catalítico.^[27]

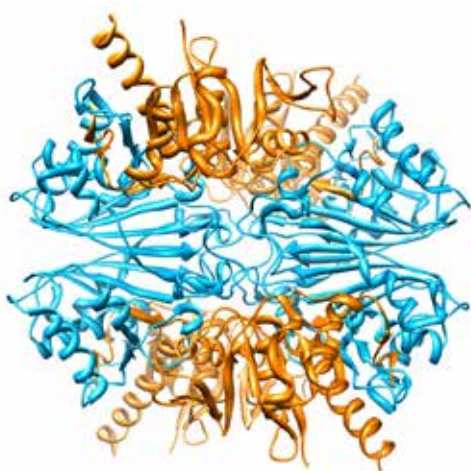


Figura 2.8. Estrutura da enzima GAPDH. Domínio do cofator NAD^+ (laranja) e catalítico (azul). Figura gerada com o programa Chimera.^[28]

Várias classes de moléculas foram testadas contra essa enzima, mas nenhuma ainda se mostrou muito promissora. Dentre essas classes podem-se citar as cumarinas, flavonóides, análogos de nucleosídeos e análogos do 1,3-BPG.^[29-33]

2.3. Referências

- [1] BJORNBERG, O.; ROWLAND, P.; LARSEN, S.; JENSEN, K. F. Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* Investigated by chemical modification and mutagenesis. **Biochem.**, v. 36, n. 51, p. 16197-16205, 1997.
- [2] LIU, S.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dehydrogenase in complex with antiploriferative agents. **Struct. Fold. & Des.**, v. 8, p. 25-33, 2000.
- [3] BJORNBERG, O.; GRUNER, A.-C.; ROEPSTORFF, P.; JENSEN, K. F. The Activity of *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase is dependent on a conserved loop identified by sequence homology, mutagenesis, and limited proteolysis. **Biochem.**, v. 38, n. 10, p. 2899-2908, 1999.
- [4] ROWLAND, P.; NORAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. Crystallization and preliminary X-ray studies of membrane-associated *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase. **Acta Crystal. Section D**, v. 56, n. 5, p. 659-661, 2000.
- [5] ROWLAND, P.; BJORNBERG, O.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Prot. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
- [6] ARAKAKI, T. L.; BUCKNER, F. S.; GILLESPIE, J. R.; MALMQUIST, N. A.; PHILLIPS, M. A.; KALYUZHNIY, O.; LUFT, J. R.; DETITTA, G. T.; VERLINDE, C. L. M. J.; VOORHIS, W. C. V.; HOL, W. G. J.; MERRITT, E. A. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Mol. Microb.**, v. 68, n. 1, p. 37-50, p. 37-50, 2008.
- [7] HANSEN, M.; NOURS, J. L.; JOHANSSON, E.; ANTAL, T.; ULLRICH, A.; LÖFFLER, M.; LARSEN, S. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. **Prot. Sci.**, v. 13, n. 4, p. 1031-1042, 2004.
- [8] DAVIES, M.; HEIKKILA, T.; MCCONKEY, G. A.; FISHWICK, C. W. G.; PARSONS, M. R.; JOHNSON, A. P. Structure-based design, synthesis, and characterization of inhibitors of human and *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenases. **J. Med. Chem.**, v. 52, n. 9, p. 2683-2693, 2009.
- [9] TAKASHIMA, E.; INAOKA, D. K.; OSANAI, A.; NARA, T.; ODAKA, M.; AOKI, T.; INAKA, K.; HARADA, S.; KITA, K. Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasit.**, v. 122, n. 2, p. 189-200, 2002.
- [10] LEHNINGER, A.L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Ed.). **Lehninger – Principles of Biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. 862-880.
- [11] FELICIANO, P. R.; CORDEIRO, A. T.; COSTA-FILHO, A. J.; NONATO, M. C. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Prot. Express. Purif.**, v. 48, n. 1, p. 98-103, 2006.

- [12] CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 399, p. 13-22, 2010.
- [13] BJÖRNBERG, O.; JORDAN, D. B.; PALFEY, B. A.; JENSEN, K. F. Dihydrooxonate Is a Substrate of Dihydroorotate Dehydrogenase (DHOD) Providing evidence for involvement of cysteine and serine residues in base catalysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 391, n. 2, p. 286-294, 2001.
- [14] FAGAN, R. L.; JENSEN, K. F.; BJÖRNBERG, O.; PALFEY, B. A. Mechanism of flavin reduction in the class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochem.**, v. 46, n. 13, p. 4028-4036, 2007.
- [15] FAGAN, R. L.; NELSON, M. N.; PAGANO, P. M.; PALFEY, B. A. Mechanism of Flavin Reduction in Class 2 Dihydroorotate Dehydrogenases. **Biochem.**, v. 45, n. 50, p. 14926-14932, 2006.
- [16] JORDAN, D. B.; BISAHA, J. J.; PICOLLELLI, M. A. Catalytic Properties of Dihydroorotate Dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: Studies on pH, Alternate Substrates, and Inhibitors. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 378, n. 1, p. 84-92, 2000.
- [17] MARCINKEVICIENE, J.; JIANG, W.; LOCKE, G.; KOPCHO, L. M.; ROGERS, M. J.; COPELAND, R. A. A second dihydroorotate dehydrogenase (Type A) of the human pathogen enterococcus faecalis: expression, purification, and steady-state kinetic mechanism. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 377, n. 1, p. 178-186, 2000.
- [18] ROWLAND, P.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*. **Structure.**, v. 5, n. 2, p. 239-252, 1997.
- [19] ROWLAND, P.; NØRAGER, S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. 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.
- [20] NØRAGER, S.; ARENT, S.; BJÖRNBERG, O.; OTTOSEN, M.; LEGGIO, L. L.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A mutants reveal important facets of the enzymatic function. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 31, p. 28812-28822, 2003.
- [21] ROWLAND, P.; LARSEN, S.; BJÖRNBERG, O.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Prot. Sci.**, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
- [22] INAOKA, D. K.; SAKAMOTO, K.; SHIMIZU, H.; SHIBA, T.; KURISU, G.; NARA, T.; AOKI, T.; KITA, K.; HARADA, S. Structures of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with substrates and products: atomic resolution insights into mechanisms of dihydroorotate oxidation and fumarate reduction. **Biochem.**, v. 47, n. 41, p. 10881-10891, 2008.
- [23] PALFEY, B. A.; BJORNBERG, O.; JENSEN, K. F. Specific inhibition of a family 1A dihydroorotate dehydrogenase by benzoate pyrimidine analogues. **J. Med. Chem.**, v. 44, n. 18, p. 2861-2864, 2001.
- [24] WOLFE, A. E.; THYMARK, M.; GATTIS, S. G.; FAGAN, R. L.; HU, Y.-C.; JOHANSSON, E.; ARENT, S.; LARSEN, S.; PALFEY, B. A. Interaction of benzoate pyrimidine analogues with class 1A dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochem.**, v. 46, n. 19, p. 5741-5753, 2007.
- [25] BJÖRNBERG, O.; JORDAN, D. B.; PALFEY, B. A.; JENSEN, K. F. Dihydrooxonate Is a substrate of dihydroorotate dehydrogenase (DHOD) providing evidence for involvement of cysteine and serine residues in base catalysis. **Archiv. Biochem. Biophys.**, v. 391, n. 2, p. 286-294, 2001.

- [26] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Glycolysis. In: **BIOCHEMISTRY**, London: Hardcover, 1999. p. 609-638.
- [27] SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C.; ARAÚJO, A. P. U.; GUIMARÃES, B. G.; JESUS, W. D. P.; MICHELS, P. A. M.; HANNAERT, V.; OLIVA, G. Trypanosoma cruzi glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Lett.**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 1998.
- [28] PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comp. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [29] MORAES, V. R. S. *et al.* Enzymatic inhibition studies of selected flavonoids and chemosystematic significance of o-methoxylated flavonoids and quinoline alkaloids in neoraputia (Rutaceae). **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, p. 380-387, 2003.
- [30] JANUARIO, A. H., LOURENCO, M. V., DOMEZIO, L. A., PIETRO, R. C. L. R., CASTILHO, M. S., TOMAZELA, D. M., FERNANDES DA SILVA, M. F. D. G., VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B., FRANCA, S. D. C., Isolation and structure determination of bioactive isoflavones from callus culture of *Dipteryx odorata*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 53, n. 7, p. 740-742, 2005.
- [31] TOMAZELA, D. M.; PUPO, M. T.; PASSADOR, E. A. P.; DA SILVA, M. F. D. G. F.; VIEIRA, P. C.; FERNANDES, J. B.; RODRIGUES FO, E.; OLIVA, G.; PIRANI, J. R. Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnífica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. **Phytochem.**, v. 55, n. 6, p. 643-651, 2000.
- [32] FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I. C.; ZOTTIS, A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; TREVISAN, M. T. S.; VILEGAS, W.; SILVA, M. G. V.; MONTANARI, C. A. Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bio. Med. Chem.**, v. 17, n. 6, p. 2476-2482, 2009.
- [33] VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; PUPO, M. T.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; ALBUQUERQUE, S.; OLIVA, G.; PAVÃO, F. Strategies for the isolation and identification of trypanocidal compounds from the Rutales. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 3, p. 617-622, 2001.

Capítulo 3

Planejamento de fármacos



Neste capítulo são abordados os aspectos fundamentais da química medicinal no planejamento de fármacos, com o uso de métodos em quiminformática: ferramenta capaz de “navegar” pelo espaço químico para que seja possível a identificação de substâncias bioativas.

3. QUÍMICA MEDICINAL

3.1. Descoberta de fármacos

O objetivo da química medicinal é a identificação de novas estruturas químicas com potencial uso terapêutico, tanto para alvos macromoleculares já conhecidos e validados, quanto para novos alvos biológicos. Pelo lado retrospectivo, a química medicinal também inclui o estudo dos fármacos existentes, suas propriedades farmacológicas e suas relações estrutura-atividade biológica. ^[1] Segundo a definição oficial dada pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada): “*a química medicinal é uma disciplina baseada na química, também envolvendo aspectos das ciências biológicas, médica e farmacêutica. Seu interesse está na invenção, descoberta, desenvolvimento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo de seu metabolismo, a interpretação de seu modo de ação ao nível molecular e a construção de relações estrutura-atividade*” ^[2].

O processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco é dividido em duas grandes fases: (i) fase pré-clínica (descoberta e otimização) e (ii) fase clínica (desenvolvimento), ^[1] Figura 3.1.

Nas primeiras etapas da fase pré-clínica, há a identificação da necessidade de uma nova terapia, ou adequação dos tratamentos existentes, juntamente com a avaliação do conhecimento sobre a doença alvo. Juntamente há a identificação e validação do alvo terapêutico (receptor, enzima, canal iônico, proteínas de membrana, DNA/RNA ou modelo celular). A correta identificação e seleção do alvo é a primeira etapa importante para o sucesso de um projeto em química medicinal. ^[3] Em seguida vem à identificação (ou descoberta) de substâncias ativas que interajam com o alvo selecionado. Os passos subsequentes incluem a identificação de substâncias químicas que apresentem atividade

biológica *in vitro* relevante, denominadas ligantes (do inglês, *hits*), e o teste de moléculas análogas em modelos biológicos apropriados.

A identificação de substâncias químicas bioativas pode-se iniciar com um banco de dados com uma grande quantidade de moléculas (da ordem de milhões), o qual será reduzido, por meio de triagem computacional (estudos *in silico*), a um banco com alguns milhares de moléculas. A identificação de esqueletos químicos, contidos nas moléculas de interesse, poderá resultar na seleção de estruturas moleculares que serão modificadas a partir de estudos de relação estrutura-atividade qualitativa (SAR) ou quantitativa (QSAR) envolvendo diversos estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*.

Na fase clínica, a proposta é o aperfeiçoamento das propriedades farmacocinéticas e o ajuste fino das propriedades farmacêuticas (formulação química) das substâncias selecionadas para que estas se tornem aptas ao uso clínico. Para que isto seja possível são feitas avaliações da tolerância em voluntários humanos saudáveis (Fase I), da eficácia e segurança em pacientes (centenas de pacientes, Fase II) seguidas de uma avaliação acerca da eficácia e de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME, Fase III) que envolve milhares de pacientes em múltiplos centros clínicos, geralmente em diversos países. [4]

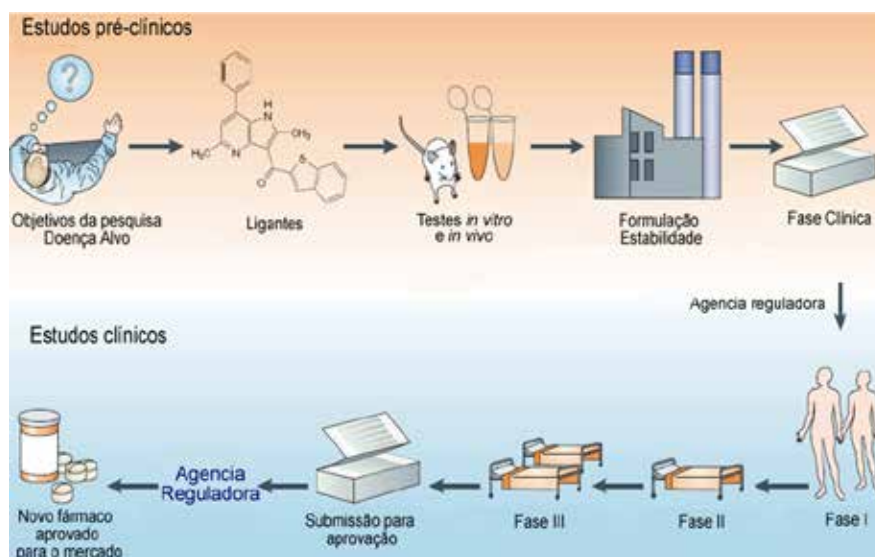


Figura 3.1. Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. [4]

Somente após a realização de todos os estudos clínicos (fases I, II e III) e demonstração adequada de dosagem e segurança a molécula em estudo, já estabelecida sob uma forma farmacêutica com eficácia terapêutica, será aprovada pelo órgão regulador (FDA nos Estados Unidos e ANVISA no Brasil) que estabelece as condições para a comercialização. Após a comercialização, continuam sendo realizados os monitoramentos dos novos fármacos, na fase IV.

3.2. As três principais fases da ação de um fármaco

A chegada de um fármaco em seu local de ação, em concentração adequada para produzir o efeito biológico desejado, necessita da ocorrência de uma série de fenômenos complexos, os quais podem ser agrupados em três fases: farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica.^[1]

A *fase farmacêutica* está relacionada com a escolha da forma de administração e com a formulação do medicamento. Na formulação é decidido se o composto irá ser administrado na forma de comprimidos, cápsulas, líquido, etc.

Para produzirem seus efeitos locais ou sistêmicos, os fármacos são manipulados ou formulados em diversas formas farmacêuticas e administrados por diferentes vias. Ambas influenciam diretamente a biodisponibilidade, parâmetro que indica a quantidade com que um fármaco alcança o local de ação.

As vias de administração são classificadas em parenteral e enteral. A via de administração parenteral é aquela em que o fármaco não passa pelo trato gastrointestinal (intramuscular, intravenosa, subcutânea, entre outras) enquanto a via de administração enteral é aquela em que o fármaco é absorvido pelo trato gastrointestinal (oral, sublingual, retal). Em ambas as vias, como esperado, a estabilidade dos fármacos no organismo durante os processos de absorção e distribuição deve ser rigorosamente

investigada durante o programa de pesquisa e desenvolvimento de um novo medicamento.

A *fase farmacocinética* controla os diferentes parâmetros que governam o caminho percorrido pelo fármaco desde a sua administração até o seu encontro com o alvo. ^[1] A interação do fármaco com o alvo resulta em uma modificação de processos fisiológicos, cuja intensidade depende, na maioria dos casos, da concentração e do tempo de permanência no sangue e tecidos. A atividade farmacológica é atribuída a um fármaco depois de definida a forma farmacêutica, a via de administração e a dose administrada, os graus de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção, e inclusive, Toxicologia (ADME/Tox), além de outros fatores como idade, sexo e estado fisiológico do paciente ou do animal em experimentação.

Durante a absorção, o fármaco ou o candidato, atravessa as membranas biológicas e organelas, processo que é fortemente dependente das características físico-químicas da substância (ionizado, não ionizado, tamanho, coeficiente de partição, etc.), até alcançar a corrente sanguínea. Essa é responsável pela sua distribuição pelo organismo, levando-o até o alvo. Uma vez que ele exerce seu efeito ele deve ser eliminado do organismo, senão a sua acumulação irá provocar efeitos colaterais. O metabolismo usualmente transforma o fármaco num composto mais solúvel em água para facilitar a sua eliminação pelas rotas de eliminação, sendo que as mais comuns são a renal (urina) e retal (fezes), mas ocasionalmente também pode ocorrer por outras vias (e.g. pulmonar, salivar, cutânea).

A *fase farmacodinâmica* está relacionada à interação do fármaco com o alvo biológico, ou seja, a complementaridade estereoelétrica (e não apenas geométrica) de sua estrutura molecular com o sítio de ligação do alvo biomacromolecular. ^[1-4] 1

O químico medicinal tem o desafio de maximizar a potência e a seletividade, e assim, minimizar os efeitos secundários indesejados produzidos pelos fármacos, considerando que as características estruturais podem conferir significativa rigidez e/ou flexibilidade às moléculas, ocasionando, inclusive, na existência de estereoisômeros, os quais podem exibir propriedades biológicas diferentes, como potência, tipos de atividade e efeitos colaterais indesejáveis. Por exemplo, a *R*-talidomida é sedativa enquanto seu estereoisômero *S*-talidomida apresenta a teratogenicidade como efeito colateral. A exploração das características estruturais no processo de otimização da atividade farmacológica, via modificação estrutural, depende, por outro lado, do entendimento da estrutura molecular tridimensional do alvo biológico.

3.3. A quiminformática na identificação de fármacos

Muitos trabalhos de pesquisa são conduzidos com o intuito de identificar moléculas protótipos, também chamados de compostos líderes. Um protótipo exibe uma atividade farmacológica considerável, porém é portador de efeitos secundários indesejáveis que não podem ser negligenciados. Este composto representa um promissor ponto de partida, no qual incidirá futuros estudos computacionais e experimentais para o refinamento da resposta biológica, até se tornar um fármaco eficaz, com ação terapêutica desejada. Vários são os caminhos para se chegar a um protótipo, como por exemplo, os ensaios aleatórios, modificação molecular de fármacos conhecidos (referidos na literatura como “*me-too compounds*”) e o uso de ferramentas em quiminformática na química medicinal.

No ensaio aleatório, ou *screening randômico*, todas as substâncias disponíveis, independentemente da natureza química, são submetidas arbitrariamente a testes biológicos contra um ou mais alvos na expectativa de se encontrar uma substância

promissora. Atualmente utiliza-se o *screening* em massa HTS (*High-Throughput Screening*) tanto em compostos sintéticos como de origem natural.

A *modificação molecular de fármacos conhecidos* baseia-se na alteração da estrutura química de fármacos existentes para produzir compostos similares, com propriedades terapêuticas ou toxicológicas superiores ao fármaco de origem. Por razões econômicas, é uma estratégia bastante aplicada atualmente pela indústria farmacêutica, com objetivo de melhorar as propriedades terapêuticas, aumentar a potência, melhorar a atividade farmacológica, minimizar a toxidez e obter formulações que sejam facilmente manipuláveis e administradas aos pacientes.

O desenvolvimento de estratégias e a aplicação de métodos computacionais para a seleção e otimização de candidatos a fármacos fazem parte da *Quiminformática*. A exploração do *espaço químico* e o delineamento das regiões estabelecidas pelo *espaço químico-biológico* só são possíveis através da criação de bancos de dados *in silico* para o armazenamento adequado das informações sobre as pequenas moléculas e os alvos macromoleculares. Como consequência disso, os métodos e ferramentas computacionais vêm se tornando parte integral das etapas de identificação e otimização de ligantes para o armazenamento, gerenciamento, análise de dados e modelagem molecular de compostos, tanto dentro das indústrias farmacêuticas quanto na academia.

O termo “*quiminformática*” foi definido pela primeira vez por Brown (1998) ^[6] como “*uma combinação de recursos para transformar dados em informação e informação em conhecimento, com o propósito de se tomar melhores decisões mais rapidamente dentro do processo de planejamento de fármacos*”. Uma definição mais ampla foi dada por Gasteiger: “*A Quiminformática consiste do uso dos métodos de informática para resolver problemas químicos*”. ^[7]

3.3.1. O espaço químico-biológico

O planejamento e desenvolvimento de um novo fármaco é um processo longo, complexo, caro e altamente arriscado ^[8]. Em uma análise de 68 fármacos aprovados, estimou-se que foram necessários em média 15 anos para que uma nova entidade química (NCE) chegasse ao mercado ao custo de 800 milhões de dólares ^[9], podendo chegar a US\$1,4 bilhão. Na fase de pesquisa, somente uma pequena fração dos compostos é selecionada para um grupo de candidatos a fármacos, para posterior desenvolvimento.

Mesmo com os altos investimentos e a introdução de novas tecnologias (química combinatória, ensaios automatizados em larga escala – HTS) pela indústria farmacêutica, a taxa de sucesso é de apenas 10% ^[10]. Cerca de 30% dos compostos que chegam aos estágios finais do desenvolvimento clínico são abandonados em decorrência da ausência de eficácia, e baixa segurança clínica e toxicológica ^[11].

Uma das dificuldades encontradas no planejamento e desenvolvimento de um composto até este se tornar um fármaco é o tamanho do *espaço químico* no qual a busca é realizada. Estima-se que o número de substâncias teoricamente sintetizáveis utilizando apenas a combinação de átomos de C, O, H, N, P, S, F, Cl, Br, I e com uma massa molecular (MM) menor que 500 Da gira entre 10^{40} a 10^{120} moléculas. Assim, dada a vastidão do espaço químico, o desafio na descoberta de fármacos é localizar aquelas regiões nas quais são mais prováveis de se encontrar substâncias biologicamente ativas.

A química medicinal navega pelo imenso espaço químico-biológico usando os métodos em *quiminformática*. ^[12] Fazem parte das atividades da Quiminformática no contexto da descoberta de fármacos: descrição, manipulação e análise de bancos de dados de estruturas químicas (virtuais ou reais); relação estrutura atividade (SAR); pós-processamento de dados obtidos em ensaios (reais ou virtuais) contra os alvos;

planejamento *de novo* para geração e otimização de compostos-líderes; ensaios *in silico* para a predição de propriedades ADME, do metabolismo e da toxicologia; mineração e visualização de dados; *ensaios virtuais*.^[13]

Os métodos utilizados para a identificação, seleção e otimização de ligantes neste trabalho são os *ensaios virtuais*, focando no alvo enzimático presente no parasito *Trypanosoma cruzi*, a enzima DHODH.

3.3.2. *Ensaio virtual*

A quiminformática possibilitou também a introdução de tecnologias avançadas na busca de fármacos. Dentre essas técnicas destacam-se o *ensaio virtual* (do inglês, *virtual screening*).^[14] Os ensaios virtuais consistem da aplicação de modelos computacionais para selecionar e/ou priorizar substâncias para os ensaios experimentais. Através de ensaios virtuais é possível pontuar, classificar e filtrar moléculas contidas em grandes bancos de dados de acordo com as suas probabilidades de possuir alguma afinidade por um determinado alvo.^[15,16]

Diante do vasto espaço químico da coleção virtual de moléculas, disponíveis no banco de dados, pode-se aplicar “filtros moleculares”, para eliminar substâncias inapropriadas ou indesejáveis. Esta “filtragem” pode ser realizada delimitando-se as propriedades físicas, conteúdo atômico, grupos funcionais e/ou propriedades topológicas, gerando uma sub-coleção, para aplicação de métodos baseados na estrutura do ligante ou receptor, Figura 3.2.

Historicamente, existem duas formas de planejamento utilizadas no ensaio virtual: o *planejamento baseado na estrutura do ligante* (LBDD) e o *planejamento baseado na estrutura do receptor* (SBDD). O planejamento baseado na estrutura do ligante é usado para identificar moléculas com características (pontos farmacofóricos, descritores estruturais) similares à dos ligantes conhecidos.^[17] O ensaio virtual baseado

na estrutura do alvo requer o uso da estrutura tridimensional do alvo, a qual pode ser obtida experimentalmente (Raios-X, RMN, microscopia eletrônica) ou computacionalmente (modelagem por homologia, *Threading*). O *planejamento integrado* pode ser realizado quando se conhecem tanto a estrutura do alvo quanto a dos ligantes. Somente as substâncias que são previstas como tendo certa afinidade pelo alvo serão selecionadas e avaliadas experimentalmente.

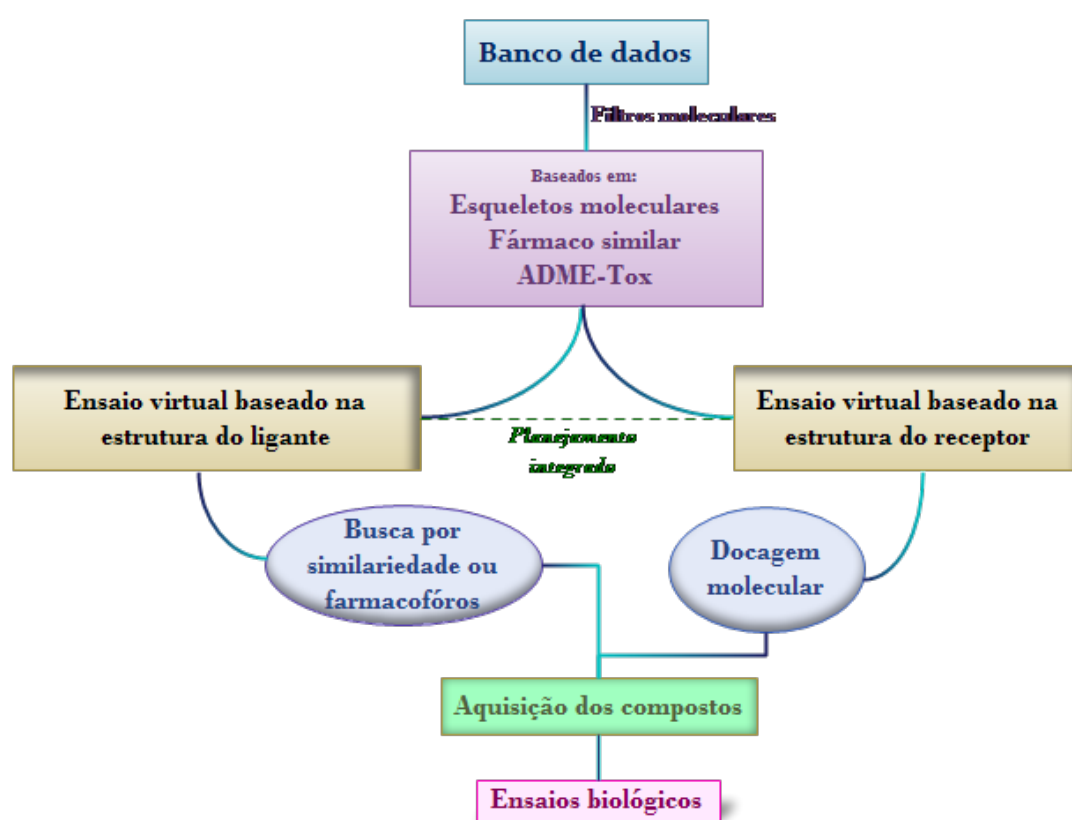


Figura 3.2. Estratégia de ensaio virtual para seleção de substâncias bioativas.

O ensaio virtual tem sido usado como uma abordagem alternativa à técnica de HTS, realizando-se o ensaio *in silico* de grandes coleções de moléculas (reais ou virtuais), buscando aqueles que apresentam uma complementaridade significativa com o sítio ativo do alvo. ^[17]

3.4. Referências

- [1] WERMUTH, C. G. Medicinal chemistry: definition 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.
- [2] WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERB, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry. **Pure Appl. Chem.**, v. 70, n. 1, p. 1129-1143, 1998.
- [3] OPREA, T. I.; TROPSHA, A. Target, chemical and bioactivity databases – integration is key. **Drug Discov. Today**, v. 3, n. 4, p. 357-365, 2006.
- [4] LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery then and now. **Nat Rev Drug Discov**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
- [5] KEARNS, G. L.; ABDEL-RAHMAN, S. M.; ALANDER, S. W.; BLOWEY, D. L.; LEEDER, J. S.; KAUFFMAN, R. E. Developmental pharmacology - Drug disposition, action, and therapy in infants and children. **New Engl. J. Med.**, v. 349, n. 12, p. 1157-1167, 2003.
- [6] BROWN, F.K. Chemoinformatics: What is it and How does it Impact Drug Discovery. In: BRISTOL, J. A. (Ed.). **An. Reports Med. Chem.**. Ann Arbor: Academic Press, 1998. v. 33, p. 375-384.
- [7] GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemom. Int. Lab. Syst.**, v. 82, n. 1-2, p. 200-209, 2006.
- [8] LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. III. The role of the medicinal chemist in drug discovery - then and now. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.
- [9] CHONG, R. C.; SULLIVAN, D. J. New uses for old drugs. **Nature.**, v. 448, n. 7154, p. 645-646, 2007.
- [10] ZHAO, H.; GUO, Z. Medicinal chemistry strategies in follow-on drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 9, p. 516-522, 2009.
- [11] HOPKINS, A. L., Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature Chem. Biol.**, v. 4, n. 11, 682-690, 2008.
- [12] GHOSE, A. K.; HERBERTZ, T.; SALVINO, J. M.; MALLAMO, J. P. Knowledge-based chemoinformatic approaches to drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 11, n. 23, p. 1107-1114, 2006.
- [13] OPREA, T. I. Chemoinformatics and the quest for leads in drug discovery. In: GASTEIGER, J.(Ed.). **Handbook of chemoinformatics**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. p. 1509-1531.
- [14] BLEICHER, K. H.; BOHM, H. J.; MULLER, K.; ALANINE, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, n. 5, p. 369-378, 2003.
- [15] OPREA, T. I; MATTER, H. Integrating virtual screening in lead discovery. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, n. 4, p. 349-358, 2004.
- [16] LEACH, A. R.; GILLET, V. J. Virtual screening. In: LEACH, A. R.; GILLET, V. (Ed.). **An Introduction to Chemoinformatics**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 159-182.
- [17] GHOSH, S.; NIE, A.; AN, J.; HUANG, Z. Structure-based virtual screening for drug discovery. **Curr. Op. Chem. Biol.**, v. 10, n. 3, p. 194-202, 2006.

Capítulo 4

Objetivos



Os objetivos fundamentais desta tese de doutorado são apresentados neste capítulo.

4. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

Û A utilização e aplicação dos métodos de Quiminformática, ensaios virtuais baseados nas estruturas dos ligantes (LBVS) e do receptor (SBVS), para a seleção de moléculas capazes de inibir a enzima diidroorotato desidrogenase do parasito *Trypanosoma cruzi* (TcDHODH), com a colaboração do Dr. Josmar R. Rocha;

Û Estabelecimento de estratégias para a seleção de moléculas com perfis estruturais e propriedades físico-químicas passíveis de otimização molecular dentro do contexto da química medicinal;

Û Estruturação de uma coleção de moléculas com base no banco de dados comercial *Zinc*, seguida da aquisição destas substâncias para serem avaliadas nos ensaios enzimáticos;

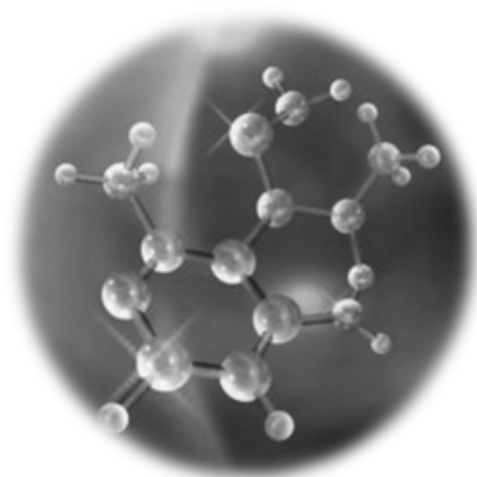
Û Desenvolvimento de um novo protocolo para expressão e purificação da enzima TcGAPDH com a inserção de um his-tag (denominada His₆-GAPDH), para que seja possível a produção da proteína com alto rendimento para sua utilização pelos membros do grupo *Nequimed-PN*;

Û Determinação a entalpia aparente de reação da enzima TcDHODH e padronizar os ensaios cinéticos utilizando o método de Titulação Calorimétrica Isotérmica, estabelecendo um protocolo geral de ensaio de inibição enzimática;

Û A validação dos métodos e das estratégias adotados para seleção das moléculas através da determinação do mecanismo de inibição e da constante de inibição (K_i^{app}) das substâncias selecionadas pelos ensaios virtuais;

Capítulo 5

Planejamento de inibidores da enzima TcDHODH



Neste capítulo será feita uma breve introdução sobre os métodos em quiminformática utilizados, assim como a estratégia e os critérios utilizados para a seleção dos compostos.

5. PLANEJAMENTO DE INIBIDORES DA ENZIMA DHODH DE *T. cruzi*

5.1. Identificação e seleção das moléculas

5.1.1. Docagem molecular

Os métodos computacionais baseados na estrutura do alvo podem ser empregados quando a estrutura do alvo é conhecida, sendo que o método mais utilizado é a docagem molecular (do inglês, *molecular docking*). Este método tenta prever a estrutura do complexo formado entre um ligante (uma pequena molécula ou até mesmo uma proteína) e uma macromolécula (enzima, DNA, canais iônicos, receptores, etc.)^[1], ou seja, a correta da orientação e conformação de uma molécula (ou fragmento) no sítio ativo (ou cavidade na proteína). Portanto, a primeira questão é definir a superfície da proteína. Elas podem ser descritas por modelos matemáticos como, por exemplo, descritores de formas geométricas ou grades (do inglês, *grid*). Alternativamente, a descrição pode envolver um tratamento, estático ou dinâmico, das cadeias proteicas, como por exemplo, rígido *versus* flexível.

As energias de interação das diferentes conformações adotadas pelo ligante ao interagir com o alvo é ordenada/ranqueada de acordo com sua complementaridade estérea e eletrostática com o sítio de interação. Neste estágio a técnica prediz a afinidade da ligação de uma série de moléculas com o alvo biomacromolecular.^[2] Este processo é chamado de *pontuação*. De centenas a milhares de moléculas no banco de dados, os ligantes mais bem pontuados são subsequentemente avaliados num ensaio enzimático (Figura 5.1).^[3]

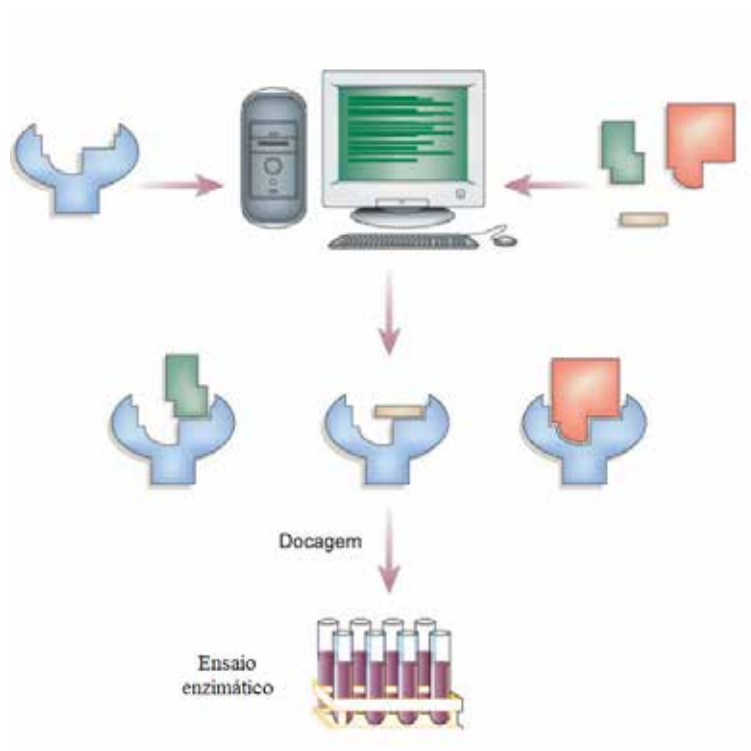


Figura 5.1. Representação geral da docagem.

Os valores das energias de interação são calculados através de uma equação matemática que é composta por vários termos representativos dos fenômenos físico-químicos envolvidos na interação intermolecular, tais como interações de hidrogênio, interações iônicas, dessolvatação, efeitos entrópicos. Esta equação é chamada de *função de pontuação*.^[4] As ferramentas de docagem mais comuns tratam o receptor como rígido e o ligante flexível. Usualmente, as funções de pontuação indicam a complementaridade estereoquímica e eletrostática entre o ligante e o alvo biomacromolecular.

Os valores de energia e inspeção visual de grupos químicos, complementaridade do posicionamento do ligante com o sítio do alvo biomacromolecular, são levados em conta para a seleção das substâncias. Estas serão subsequentemente testadas em ensaios bioquímicos de inibição enzimática. Essa etapa, dentre outras adotadas na seleção das substâncias, está representada esquematicamente na Figura 5.2.

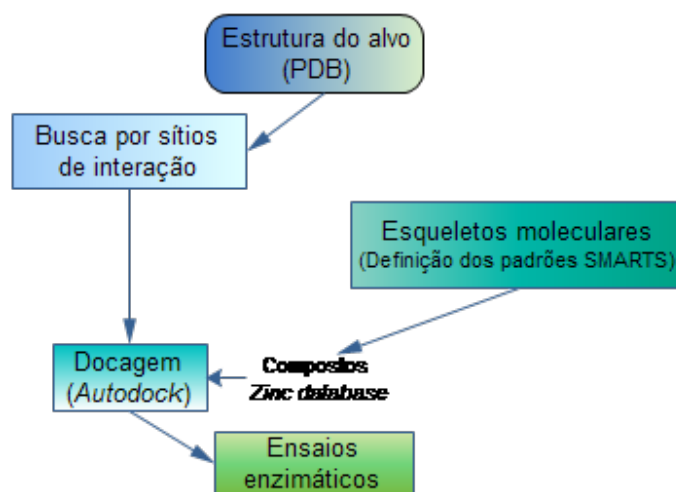


Figura 5.2. Esquema geral para a busca de inibidores da enzima TcDHODH.

5.2 Resultados e Discussões

5.2.1 Análise das estruturas das DHODHs

Inicialmente foi feita uma busca no banco de dados de proteínas (*PDB databank*) por estruturas cristalográficas da enzima TcDHODH de HsDHODH. Para a comparação e análise das diferenças estruturais entre a enzima TcDHODH e HsDHODH, utilizou-se o módulo de alinhamento de proteínas *MatchMaker*, implementado no programa de análises gráficas *UCSF Chimera*. A busca por regiões nas proteínas (cavidades, descritas na seção 5.2.2) passíveis de acomodar ligantes, foi realizada utilizando-se o programa *SiteID*; disponível no pacote computacional de modelagem Sybyl8.0® (Tripos, Inc). Para mais detalhes com relação à preparação das estruturas, dos dados de entrada utilizados para o programa, os descritores utilizados para a busca das cavidades, consultar a tese do Dr. Josmar R. Rocha.^[5]

Após a busca das estruturas cristalográficas presentes do banco PDB, os modelos com código 2E6F e 2FPV foram escolhidos para as análises posteriores por apresentarem os melhores conjuntos de parâmetros estruturais, conforme Tabela 5.1. Estas estruturas foram escolhidas por terem altas resoluções e ótimos parâmetros cristalográficos.

Tabela 5.1. Código PDB do modelo, parâmetros estruturais e ligantes complexados

	Código	Resolução (Å)	R_{factor}	R_{free}	(R_{free} - R_{factor})	Ligante
TcDHODH	2E6F	1,26	0,166	0,18	0,014	Oxonato
HsDHODH	2FPV	1,80	0,195	0,205	0,010	Orotato e ILC

ILC: 3-{(3-fluoro-3'-metoxibifenil-4-il) aminocarbonil}tiofeno-2-carboxílico

Uma vez que a enzima DHODH é encontrada em ambos os organismos humano e do parasito *T. cruzi*, faz-se necessário o planejamento de inibidores seletivos. Neste trabalho, com o objetivo de encontrar moléculas que interajam preferencialmente com a enzima TcDHODH, o planejamento molecular foi feito de modo a explorar as diferenças estruturais entre as enzimas TcDHODH e HsDHODH.

A porcentagem de *identidade* obtida com o alinhamento, usando o método BLOSUM91 no programa Chimera^[6], da estrutura do parasito (2E6F) com a enzima de humanos (2FPV) é de 27%. Não obstante, compartilham de um grau de identidade de aproximadamente 77 % quando se trata apenas dos resíduos de aminoácido do sítio catalítico envolvidos na interação com o substrato. Na Figura 5.3 é mostrado o alinhamento entre as sequências primárias.

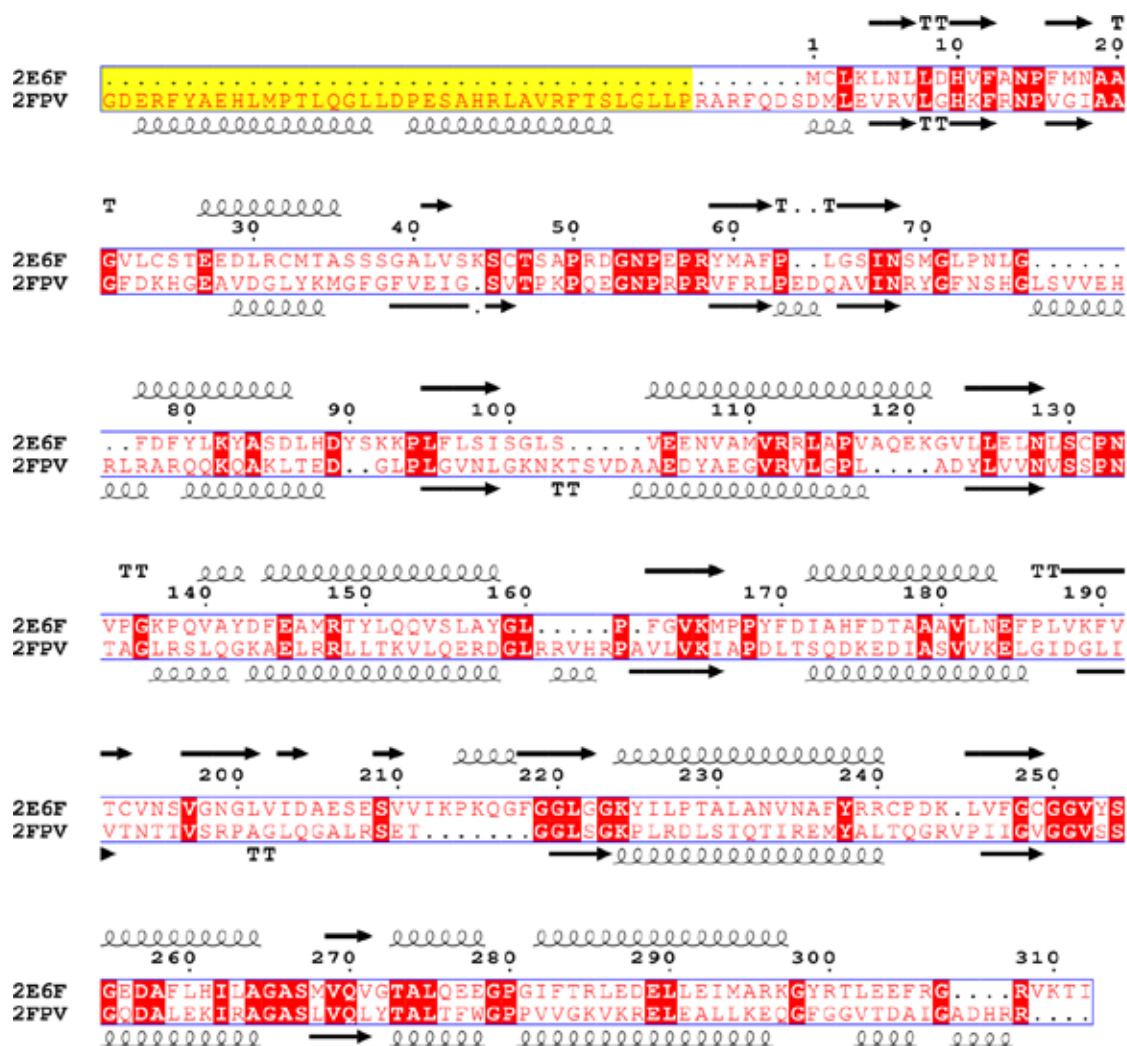


Figura 5.3. Alinhamento entre as sequências primárias dos monômeros das enzimas TcDHODH (2E6F) e HsDHODH (2FPV). Em amarelo a região da HsDHODH responsável pela interação com membrana celular (formada por três alfa hélice). Em vermelho os resíduos de aminoácidos idênticos nas proteínas. A estrutura secundária está representada na forma de helicóides (alfa hélice) e a em setas (folhas betas).

Na Figura 5.3 podemos observar uma das diferenças estruturais mais importantes entre as enzimas DHODHs, pois a enzima HsDHODH (monomérica) possui duas alfa-hélices sequenciais formadas entre os resíduos Gly33 e Pro69 (em amarelo) e que não estão presentes na TcDHODH (dimérica), Figura 5.4. Esta região é responsável pela formação do sítio de interação para o qual todos os fármacos inibidores da enzima HsDHODH foram desenvolvidos.^[7] A ausência desta região na enzima homóloga TcDHODH impossibilita o planejamento de inibidores com o mesmo mecanismo da HsDHODH.

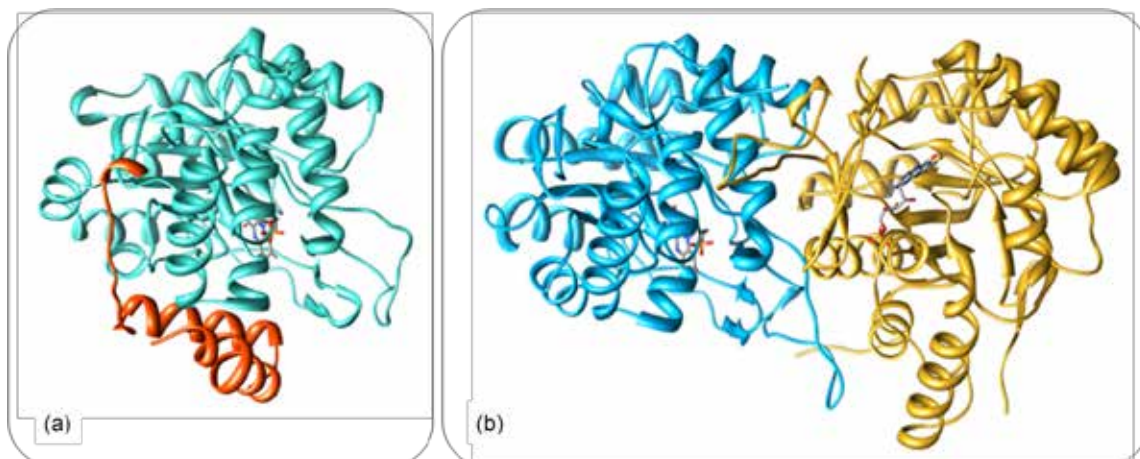


Figura 5.4. Estrutura da a) HsDHODH e b) TcDHODH.

De acordo com o alinhamento das estruturas primárias, observamos que pelo menos 83 resíduos de um total de 311 são conservados entre as proteínas. Entretanto, como o alinhamento molecular tridimensional, é possível perceber uma alta similaridade entre os resíduos de aminoácidos do sítio catalítico. Uma vez que tal alinhamento não depende essencialmente da sequência primária das duas proteínas, podemos considerar também os resíduos pertencentes a posições totalmente distintas na sequência primária, mas que compartilham da mesma posição no quando agrupados no espaço tridimensional.

O alto grau de similaridade entre os sítios catalíticos das duas enzimas é de certa forma esperado, uma vez que catalisam a mesma conversão de um dos produtos, DHO em orotato. A Figura 5.5 ilustra as principais interações dos resíduos do sítio ativo com os respectivos ligantes co-complexados.

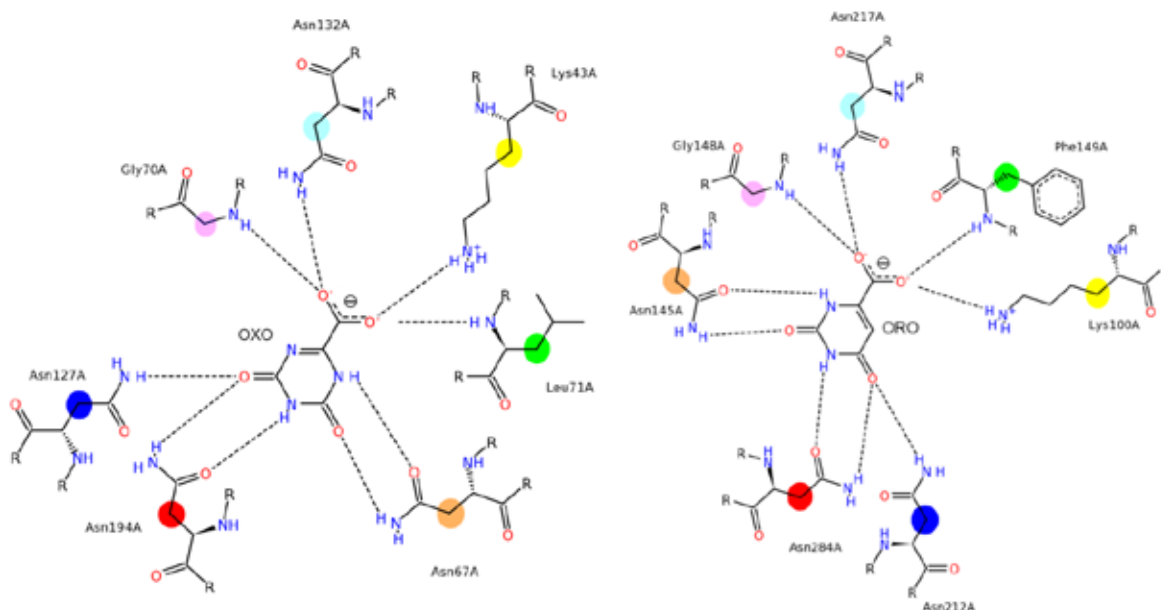


Figura 5.5. Mapa de interações do complexo (a) oxonato-TcDHODH (2E6F) e (b) orotato-HsDHODH (2FPV). Resíduos idênticos ou com interações equivalentes estão marcados em círculos com a mesma cor. Figuras geradas pelo *PoseView*.

Uma informação importante quando comparamos os mapas mostrados na Figura 5.5 é que ambas moléculas (oxonato e orotato) interagem com resíduos de asparagina e lisina, no sítio ativo, e as ligações com átomos que compõem a cadeia principal são conservados em ambas as estruturas das enzimas, definido por interações extremamente complementares por ligações de hidrogênio. Com base nestas interações, o produto de reação (ORO, Figura 5.5b) foi definido como esqueleto na busca de novos inibidores. A busca por novas regiões passíveis de interação, para que se consiga a seletividade, são descritas a seguir.

5.2.2 Cavidades passíveis de acomodar ligantes

As regiões da enzima com características de sítios de interação, exploradas utilizando o programa *SiteID* [8], foram identificadas preenchendo todas as cavidades da proteína com moléculas de água ou esferas, com o modo: *busca por cavidades locais*, útil para a busca de prováveis sítios de interação para pequenas moléculas. A busca

resultou em cinco cavidades, como mostrado na Figura 5.6, para a enzima TcDHODH e HsDHODH.

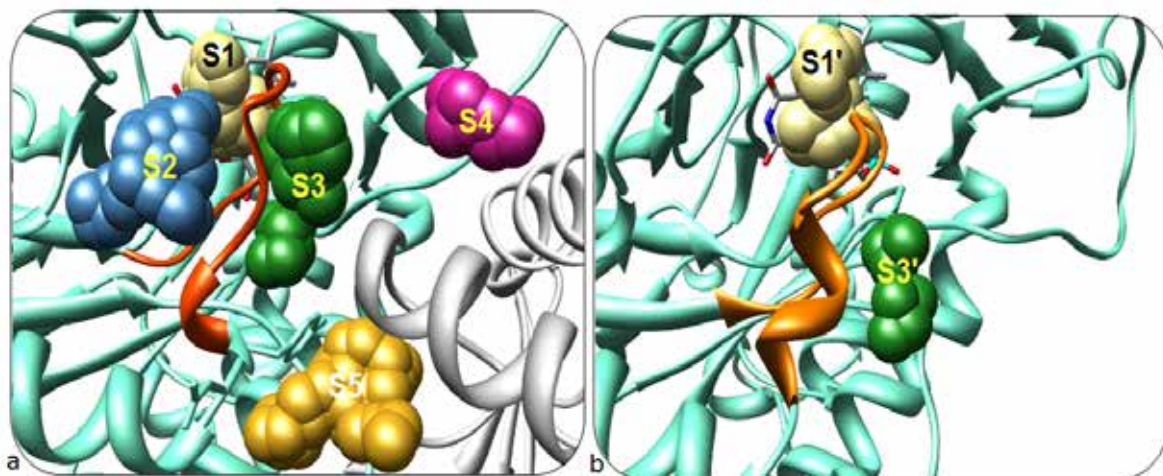


Figura 5.6. Estruturas 3D das DHODHs geradas pelo programa *SiteID*. As esferas preenchem os sítios, definindo as cavidades para as enzimas; a) TcDHODH: S1 (sítio catalítico, Bege), S2 (Azul), S3 (Verde), S4 (Rosa) e S5 (Amarelo); b) HsDHODH: S1' (sítio catalítico, Bege) e S3' (verde).

Os sítios S1 e S1' estão definidos como a região pertencente ao sítio catalítico das enzimas DHODHs. Nota-se que o sítio S2 encontra-se na trajetória pela qual ocorre à entrada dos substratos no S1, sendo assim, S2 uma extensão de S1. Não há a região S2 na enzima HsDHODH, o que evidencia a possibilidade do planejamento de inibidores seletivos para a enzima TcDHODH, utilizando uma região nunca antes explorada.

Em laranja, a alça ativa, composta pelos resíduos Leu128-Ala140, a qual desempenha um papel fundamental durante a catálise ^[9]. Uma análise do fator de temperatura, b_{factor} , que apresenta valor bastante elevado para essa alça, indica que ocorrem mudanças conformacionais nessa seção de aminoácidos, evidenciando sua alta flexibilidade. Nos modelos cristalográficos da enzima TcDHODH disponíveis no PDB até o momento, somente o estado fechado da alça foi observado, já que o arranjo cristalino da TcDHODH favorece este estado.

As regiões S3 e S3' encontram-se localizada atrás da alça ativa. Pode-se supor que esta região seja formada para a movimentação da alça e para o acesso dos substratos

a S1. Na comparação entre as cavidades S3 (TcDHODH) e S3' (HsDHODH), há uma semelhança entre a esta região. Por outro lado, o sítio S4 só é encontrado na TcDHODH, pois sua ocorrência é devido à formação do dímero. Nessa região são encontradas moléculas de glicerol (substância utilizado nos ensaios de cristalização da enzima) co-cristalizadas.

O sítio S5 é constituído por resíduos altamente conservados entre os membros da Classe 1A das DHODHs. Os resíduos de aminoácidos desta interface são importantes para a dimerização da proteína, propostos de estarem envolvidos na sinalização entre os monômeros durante o processo de catálise.^[10]

5.2.3 Cavidade escolhida para o planejamento de inibidores enzimáticos

Após a análise da estrutura das enzimas DHODHs, com o objetivo de guiar a busca por inibidores seletivos para a enzima TcDHODH, dentre as várias regiões identificadas como sítios passíveis de acomodar substâncias capazes de modular atividade enzimática, decidiu-se focar pela busca de inibidores que interagissem nos sítios S1 e S2. Esta escolha foi feita pelo fato de S2, além se uma extensão do sítio ativo, não ser encontrado na enzima de humanos.

O sítio ativo, S1, é caracterizado pela presença de vários resíduos capazes de interagir, através ligações de hidrogênio, com os substratos, formando uma rede de interações específicas para o reconhecimento molecular. Então, decidiu-se buscar por substâncias que mantivessem o esqueleto da molécula de orotato (Figura 5.7).

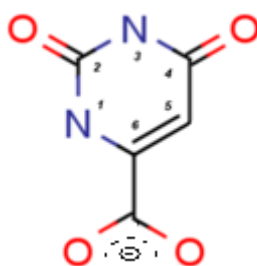


Figura 5.7. Orotato, substância utilizada como referência na busca de novas moléculas.

Assim, selecionou-se desde moléculas com pequenas modificações em relação à estrutura de referência até moléculas que se estendessem em direção ao sítio S2, verificando o efeito destas modificações moleculares na atividade enzimática. A representação da posição relativa dos sítios do complexo orotato/TcDHODH, (código PDB 2E6F) está demonstrada na Figura 5.8.

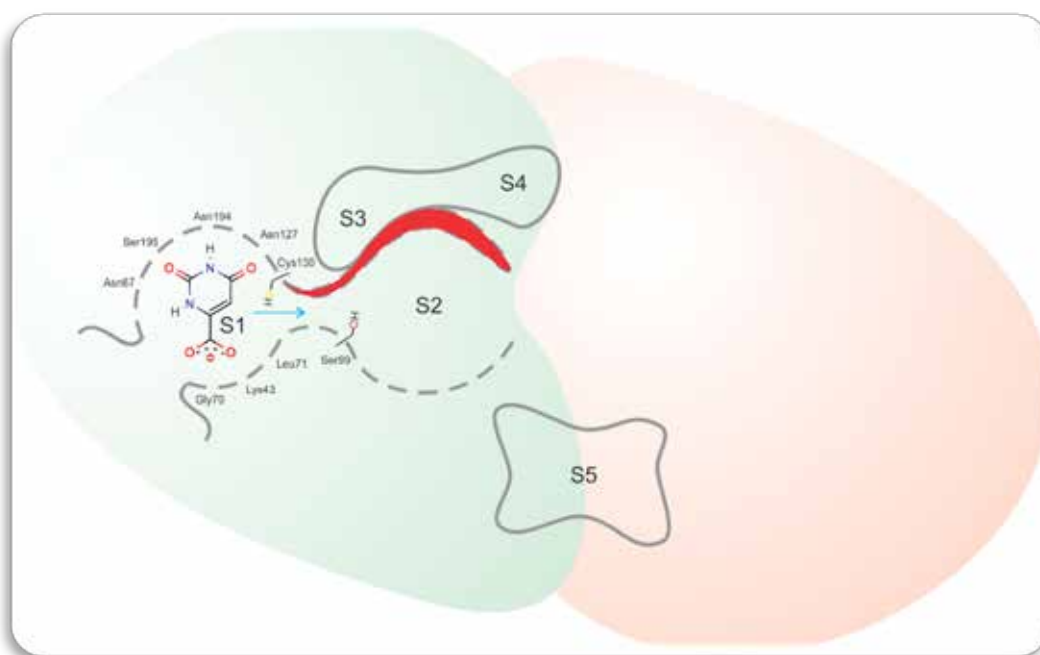


Figura 5.8. Posições relativas dos sítios na enzima TcDHODH. Molécula de orotato em S1, usada como referência na busca de novos inibidores. As linhas pontilhadas indicam as regiões não-expostas ao solvente. A alça ativa está indicada em vermelho.

5.2.4 Substâncias selecionadas para os ensaios enzimáticos

5.2.4.1 Moléculas da primeira geração

Os resultados da busca por sítios de interação (ou novas cavidades) foram utilizados para guiar diversas buscas por análogos do produto de reação (Figura 5.7). Após uma extensa busca por subestruturas no *ZINC database* ^[11] e utilizando as ferramentas de buscas disponíveis nos bancos de dados *Scifinder Scholar* ^[12] e *Emolecules* ^[13], cerca de 200 moléculas foram selecionadas para a docagem molecular. As estruturas de alguns dessas substâncias estão representadas na Figura 5.9. A

docagem foi realizada utilizando o programa *Autodock* (4.0) ^[14], delimitando a região do sítio na qual as moléculas seriam docadas, tendo como referência o resíduo de cisteína catalítica (Cys130).

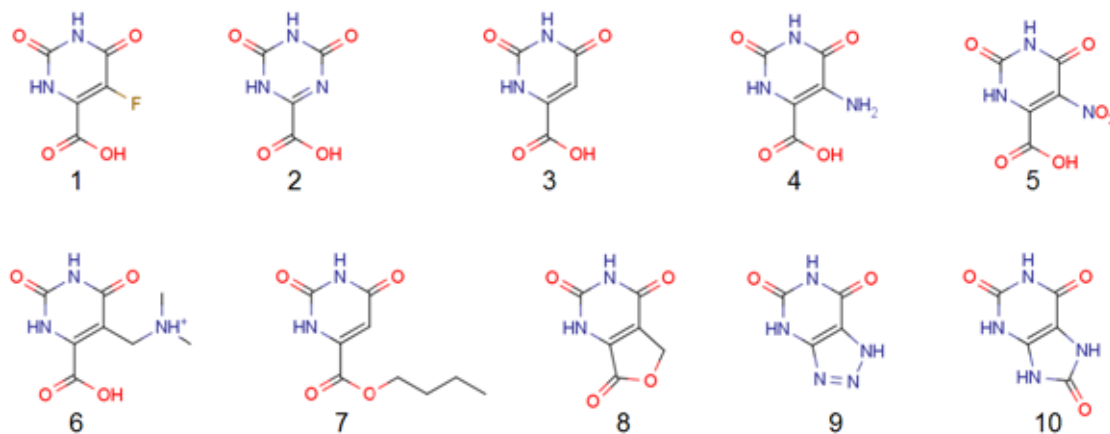


Figura 5.9. Substâncias da primeira geração selecionados para os ensaios contra a TcDHODH.

5.2.4.2 Moléculas da segunda geração

Na segunda geração de moléculas (Fig. 5.10), adotou-se o protocolo de docagem implementado no programa *Maestro*, da empresa Schrödinger®, denominado *docagem com ajuste induzido* (do inglês, *Induced Fit Docking* - IFD). ^[15] A inserção de alguma flexibilidade durante a docagem dos ligantes contendo substituintes mais volumosos na posição C5 do anel pirimidinodiona é uma tentativa de minimizar os contatos desfavoráveis dos substituintes com resíduos localizados na região entre os sítios S1 e S2, mais especificamente, os resíduos Ser199, Cys130 e Asn127. Assim, novas moléculas foram adquiridas comercialmente, com maior massa molecular, a fim de se obter inibidores que pudessem interagir em regiões que se estendem além do sítio catalítico, com base na estrutura dos inibidores da primeira geração. Foram adquiridas 16 novas moléculas.

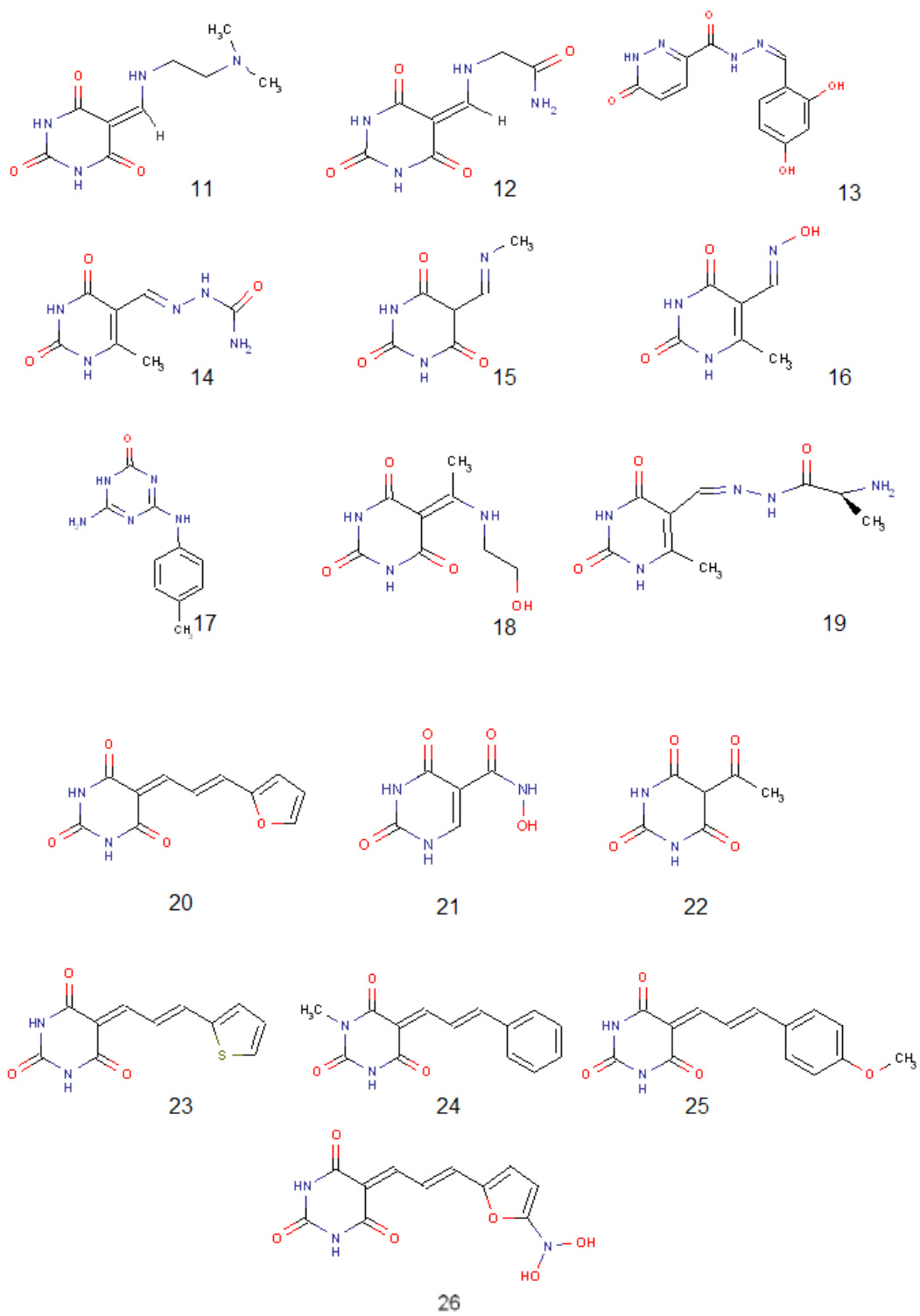


Figura 5.10. Substâncias da segunda geração selecionadas para os ensaios contra a TcDHODH.

5.3 Referências

- [1] BROOIJMANS, N.; KUNTZ, I. D. Molecular recognition and docking algorithms. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 32, p. 335-373, 2003.
- [2] LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein-ligand interactions. Docking and scoring: successes and gaps. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006
- [3] SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
- [4] KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 11, p. 935-949, 2004.
- [5] ROCHA, J. R. Planejamento de inibidores das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. **Tese de Doutorado**, 2010.
- [6] PETERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comp. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [7] DAVIS, J. P.; CAIN, G. A.; PITTS, W. J.; MAGOLDA, R. L.; COPELAND, R. A. The Immunosuppressive Metabolite of Leflunomide Is a Potent Inhibitor of Human Dihydroorotate Dehydrogenase. **Biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1270-1273, 1996.
- [8] Tripos Bookshelf 8.0, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.
- [9] FAGAN, R. L.; JENSEN, K. F.; BJÖRNBERG, O.; PALFEY, B. A. Mechanism of Flavin Reduction in the Class 1A Dihydroorotate Dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. **Biochemistry**, v. 46, n. 13, p. 4028-4036, 2007.
- [10] ROWLAND, P.; BJORNBERG, O.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Prot. Science**, v. 7, n. 6, p. 1269-1279, 1998.
- [11] IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC – a free database of commercially available compounds for virtual screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.
- [12] RIDLEY, D. D. Introduction to structure searching with SciFinder scholar. **J. Chem. Edu.**, v. 78, n. 4, p. 559-560, 2001.
- [13] EMOLECULES – Chemical structure drawing search. Disponível em: <<http://www.emolecules.com>>. Acesso em 20 jan. 2011.
- [14] USING AUTODOCK 4 FOR VIRTUAL SCREENING. Disponível em: <<http://autodock.scripps.edu/faqs-help/tutorial/using-autodock4-for-virtual-screening>>. Acesso em: 22 jan. 2011.
- [15] SHERMAN, W.; DAY, T.; JACOBSON, M. P.; FRIESNER, R. A.; FARID, R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 2, p. 534-553, 2005.

Capítulo 6

Biologia Molecular: ferramenta para obtenção do alvo biológico



Neste capítulo são abordados os aspectos fundamentais do uso da biologia molecular para obtenção do alvo biomacromolecular, necessário para os estudos calorimétricos e cristalográficos

6. BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA OBTENÇÃO DO ALVO BIOLÓGICO

6.1. DNA e Clonagem Molecular

Até a década de 70, o DNA era o componente celular mais difícil de ser analisado. A partir de então, novas tecnologias foram desenvolvidas permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado de clonagem gênica. Muitas destas técnicas são provenientes da Genética Microbiana, Bioquímica, Imunologia e permitiram a determinação da sequência de um gene e conseqüentemente, da proteína codificada por este. ^[1,2]

A técnica central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas, contendo o gene de interesse. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes: primeiro, o *fragmento do DNA* de interesse chamado de *inserto* (ou *fragmento* com o gene de interesse) é ligado à outra molécula de DNA chamada de *vetor de clonagem molecular* para formar o que se chama de *DNA recombinante*; segundo, a molécula do *DNA recombinante* é introduzida numa célula hospedeira, num processo denominado transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é chamada de transformante ou *célula transformada*. Um único transformante, em determinadas condições, produz milhares de cópias do DNA recombinante. ^[1-3]

Os vetores de clonagem molecular apresentam características especiais que os tornam excelentes veículos de clonagem. Um exemplo de vetor é o *plasmídeo*, pequena molécula circular de DNA dupla fita, que contém os elementos necessários para a sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência da célula hospedeira a antibiótico. Para que um plasmídeo seja um bom vetor de clonagem, este deve conter as

seguintes propriedades: i) possuir uma *origem de replicação* (O), ou seja, uma sequência de DNA que permita que o vetor seja replicado na célula hospedeira; ii) apresentar dois ou mais sítios de clivagem para as enzimas endonucleases de restrição. O conjunto destes sítios é denominado de *múltiplos sítios de clonagem* (MSC), e é o local onde o inserto é incorporado ao vetor de clonagem; iii) possuir um gene que codifica um produto que distingue a célula transformada da célula não transformada, como o gene que confere resistência a antibiótico específico e/ou um gene que modifica a coloração da célula, quando expresso (A). A Figura 6.1 ilustra as principais características estruturais de um plasmídeo.

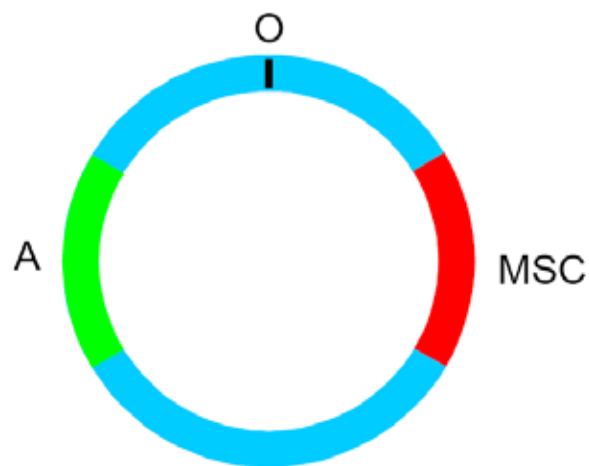


Figura 6.1. Estrutura molecular de um plasmídeo típico usado em clonagem molecular; representado o gene de resistência (A), a região de múltiplos sítios de clonagem (MSC) e a origem de replicação (O).

6.2. Materiais

A enzima de restrição *NdeI* foi adquirida da empresa Fermenta e a enzima *BamHI* da Promega. *T4 DNA ligase* e o isopropil- β -D-tiogalactosídeo (IPTG) foi obtido da Invitrogen Life Technologies (São Paulo, BR). O vetor *pET-28a(+)* e a bactéria *BL21(DE3)* foram adquiridas da Novagen (Madison, WI). O *QIAprep Miniprep Kit* e a coluna de purificação de afinidade Ni-NTA foi obtida da Qiagen (Hilden, Germany) e o

antibiótico canamicina da Calbiochem (La Jolla, CA). Os marcadores de peso molecular usados no SDS-PAGE foram comprados da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O reagente trietanolamine (TEA) da Synth, EDTA da GibcoBRL, HCl da QHEMIS, NaHAsO₄.7H₂O da Vetec e o D,L- gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e o b-nicotinamida adenina dinucleotídio oxidado (NAD⁺) da Sigma Aldrich.

6.3. Procedimentos experimentais

6.3.1. Produção heteróloga da enzima DHODH de *Trypanosoma cruzi*

A expressão da enzima DHODH foi realizada conforme o protocolo descrito na literatura.^[4] A expressão da TcDHODH foi realizada utilizando o vetor de expressão pET28 para transformar *E. coli* BL21 (DE3). Após a diluição do pré inoculo (1:100), o meio de cultura, contendo 30 µg mL⁻¹, foi mantido a 37 °C, 225 rpm até atingir a densidade óptica (DO)_{600nm} de 0,5-0,6. A expressão da proteína foi induzida com 1 mM de IPTG. Após atingir a DO a temperatura foi diminuída para 25 °C e mantida sob a mesma agitação por 5 h. Para o isolamento das células, o material foi centrifugado a 5.000 rpm, 4 °C, por 10 minutos. A purificação da enzima foi realizada utilizando cromatografia por afinidade. A eluição da proteína foi feita através de um gradiente crescente de imidazol (25 mM, 50 mM e 100 mM) em 100 mM fosfato de sódio, 50 mM NaCl, pH 8,0. As frações coletadas foram submetidas a uma análise por 15% SDS-PAGE. A proteína com alto grau de pureza foi dialisada e concentrada em 20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8,0, tampão utilizado para os ensaios cinéticos (Capítulo 8). A determinação da concentração foi realizada em um espectrofotômetro Hitachi U-2001, utilizando o coeficiente de extinção molar de 15840 cm⁻¹.

6.3.2. Produção heteróloga da enzima GAPDH de *Trypanosoma cruzi*

Para a produção heteróloga da enzima glicosomal GAPDH, o gene referente à mesma foi clonado primeiramente no vetor de expressão pET3A.^[5] Um dos objetivos da mudança do protocolo de expressão foi a tentativa de realizar a purificação em uma única etapa, por cromatografia por afinidade, da enzima de interesse, diminuindo o tempo e o custo do processo de produção. Além disso, a redução no número de etapas de purificação possivelmente acarretaria em um aumento no rendimento da proteína. A estratégia abordada para esta finalidade foi a troca do plasmídeo utilizado na expressão da TcGAPDH.

O plasmídeo pET3A-TcGAPDH foi substituído pelo plasmídeo pET28A (Novagem). A proteína produzida a partir do plasmídeo pET3A-TcGAPDH (protocolo antigo) exige duas etapas de purificação: utilização da coluna hidrofóbica de fenil sefarose (Amerrochan) seguida de cromatografia de troca catiônica em coluna celulose fosfato (Whatman)^[6]; com o novo plasmídeo estas etapas foram substituídas por um único processo de purificação, em coluna aberta de níquel iônico imobilizado covalentemente com ácido nitriloacético sobre resina de agarose.

6.3.2.1. Mudança de Plasmídeo de Expressão da enzima GAPDH

O vetor de expressão pET3A (*Addgene*) contendo o gene da TcGAPDH foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Glaucius Oliva da Universidade de São Paulo, São Carlos, BR.^[6] Retirou-se uma amostra da bactéria congelada *E. coli* (DH5 α) com o plasmídeo pET3A-TcGAPDH (-80°C) e da bactéria *E. coli* BL21 (DE) com o pET28A em 5 mL do meio *Luria broth* (LB) autoclavado e adicionou-se 5 μ l do antibiótico ampicilina (50 μ g/mL) para a bactéria contendo o plasmídeo pET3A e 5 μ l do antibiótico canamicina (50 μ g/mL) para a bactéria contendo o plasmídeo pET28A

canamicina. As colônias foram deixadas para crescer por um período de 12h a 37°C e 250 rpm.

Para a extração do DNA plasmidial, centrifugou-se as células durante 5 minutos, 1 – 10 mL de cultura a 13,2 rpm. Em seguida os *pellets* (células centrifugadas) foram ressuspensos e rompidos com solução tampão alcalina, precipitando as demais proteínas presentes no meio celular, restando apenas o DNA plasmidial em solução aquosa. Purificou-se e armazenou-se a – 20°C. Para esta etapa utilizou-se os *Kits Minipreps promega (Wizard Plus SV Miniprep DNA purification System)*.

Assim, foram realizadas as clivagens nos múltiplos sítios de clonagem utilizando as enzimas de restrição *NdeI* (Empresa Fermenta) e *BamHI* (Empresa Promega), caracterizando uma digestão dupla. Nesse processo, o plasmídeo pET3A é linearizado para a posterior remoção do fragmento do gene da TcGAPDH.

O plasmídeo pET28A também é linearizado para a inserção do gene de interesse. As proporções de soluções adicionadas ao sistema foram: 15 µL do plasmídeo pET28A, 12 µL do tampão Tango 2X, 29 µL de água livre de nuclease, 2 µL de enzima *NdeI* e 2 µL enzima *BamHI*. Na solução com o plasmídeo pET3A foram adicionados 10 µL do plasmídeo pET3A, 12 µL do tampão Tango 2X, 34 µL de água livre de nuclease, 2 µL da enzima *NdeI* e 2 µL da enzima *BamHI*. Os sistemas foram deixados na estufa a 37 °C por 5h para ação das enzimas.

Após a fragmentação, o plasmídeo pET3A e o fragmento contendo o gene da TcGAPDH foram separados das demais impurezas da solução por corrida eletroforética, durante 30 min, e as bandas registradas foram recortadas e purificadas. Após a etapa de purificação, segue novamente o processo de eletroforese, desta vez para checar se o gene e o plasmídeo de interesse foram isolados, Figura 6.2. As seguintes proporções das soluções foram usadas para a eletroforese:

Banda 1) 1 μL do marcador de peso molecular, 4 μL de água livre de nuclease, 1 μL de corante.

Banda 2) 3 μL de plasmídeo linearizado pET28A, 2 μL de água livre de nuclease e corante.

Banda 3) Gene da TcGAPDH 3 μL , 2 μL de água livre de nuclease e 1 μL corante.

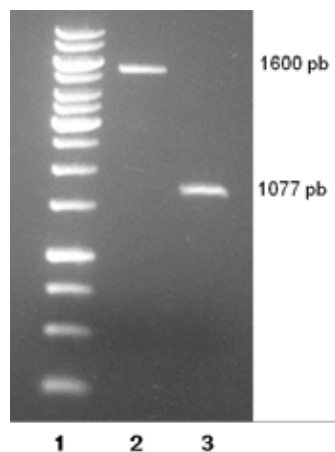


Figura 6.2. Gel de eletroforese: 1) Banda do marcador de massa molecular, 2) banda do plasmídeo linearizado pET28A com 1600 pares de base e a 3) banda do gene da TcGAPDH, 1077 pares de base.

Para a ligação do plasmídeo pET28A com o gene TcGAPDH, foi utilizada a enzima *T4 DNA ligase*, com a finalidade de ligar as extremidades dos fragmentos de DNA com as extremidades 3'-hidroxil e 5'- fosfato do plasmídeo linearizado. As proporções testadas foram de 3:1 (inserto: vetor). Deixou-se este sistema a 4°C por 12h. Em seguida realizou-se a transformação das bactérias competentes de *E. coli DH5 α* (tratadas com CaCl_2), por choque térmico. Plaqueou-se e deixou-se a 30°C na estufa por 12h. Em seguida armazenou-se a 4 °C. Após a transformação e crescimento das bactérias, foram retiradas 7 colônias e checkou-se onde o plasmídeo havia sido inserido, Figura 6.3.

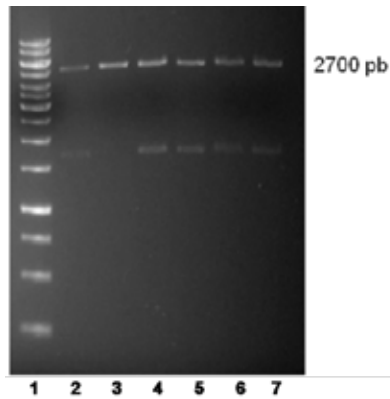


Figura 6.3. Gel de eletroforese: 1) Banda do marcador de peso molecular; 2-7) Banda o gene da TcGAPDH com o plasmídeo PET28A, com aproximadamente 2700 pares de base.

Como mostrado na Figura 6.3, todas as colônias checadas foram transformadas com sucesso com o plasmídeo de interesse. Em seguida, adicionou-se 100 ng dos plasmídeos recombinantes em amostras das células competentes de *E.coli* (*BL21* DE3) e verificou-se que o sistema expressa a enzima TcGAPDH (mini ensaio). Nas etapas seguintes, a expressão foi realizada em cultura 500 mL.

6.3.2.2. Expressão e Purificação da enzima GAPDH

A transformação para a bactéria de expressão foi realizada por choque térmico: incubadas no gelo por 30 min., seguido de 120 s a 42 °C (em banho termostatizado) retornando a 5 min. no gelo. Plaqueou-se e armazenou-se na estufa a 37°C de 12-16 h. O pré-inóculo foi realizado em células de expressão *E. coli BL21* em 5 mL do meio e 5 µL canamicina (50 µg/mL). Deixou-se em período de aproximadamente 12 h (ON) a 37 °C, 250 rpm.

A indução foi realizada adicionando-se 500 µL de antibiótico canamicina (50 µg/mL) para 500 mL do meio LB. Diluiu-se 1-100 do pré-inóculo. Deixou-se por aproximadamente 01h30min a 37 °C, 250 rpm. Mediu-se a densidade ótica (D.O.) com o Espectrofotômetro UV-vis (600 nm) obtendo-se um valor de 0,7. Adicionou-se o

agente indutor isopropil-b-D-galactosídeo (IPTG) para ficar na solução a uma concentração final de 0,4 mM. Deixou-se ON a 20 °C, 250 rpm.

Para o isolamento das células, foi feita uma centrifugação a 5.000 rpm, 4 °C, por 10 min. Ressuspendeu-se o *pellet* com tampão (100 mM fosfato de sódio, 50 mM NaCl, 100 µM PMSF e 420 µM NAD⁺ em pH 8.0).

Previamente à etapa de purificação, sonicou-se e em seguida centrifugou-se por 30 min, 13000 rpm a 4 °C. O extrato lisado, contendo a proteína de interesse, foi colocado na coluna para o processo de purificação, realizado a 4°C. Eluiu-se a coluna de Ni-NTA em tampão TP (TP = 100 mM Fosfato de sódio, 50 mM NaCl, 5mM b-mercaptanol, 10 mM NAD⁺, pH 8.0) com concentrações crescentes de imidazol (0, 50, 100, 250 e 500 mM). Coletou-se as amostra referente a cada etapa de eluição da proteína para análise em SDS–PAGE 15%, Figura 6.4.

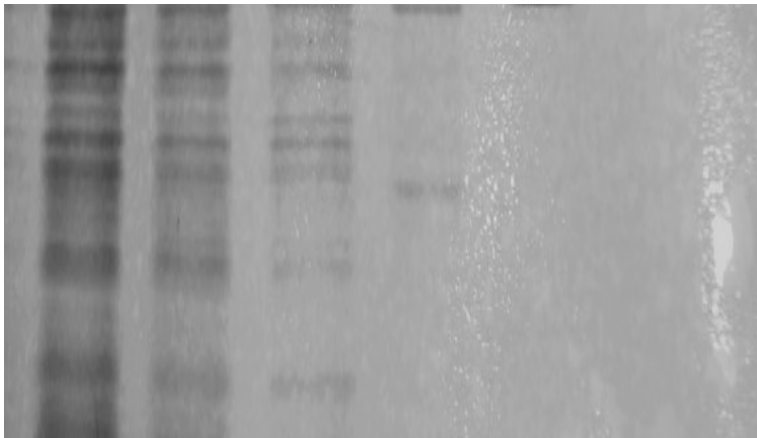


Figura 6.4. Gel de Eletroforese SDS–PAGE (15%). 1: Marcador de peso molecular (40, 50, 60 kDa); 2: cultura de BL21 (DE3) antes da indução com IPTG; 3: induzido com IPTG, 4: sobrenadante; 5: *pellet*; 6 - 9 frações eluídas da coluna de afinidade: 50, 100, 250 e 500 mM de imidazol, respectivamente. 8: banda de aproximadamente 45 kDa correspondente a His₆-TcGAPDH.

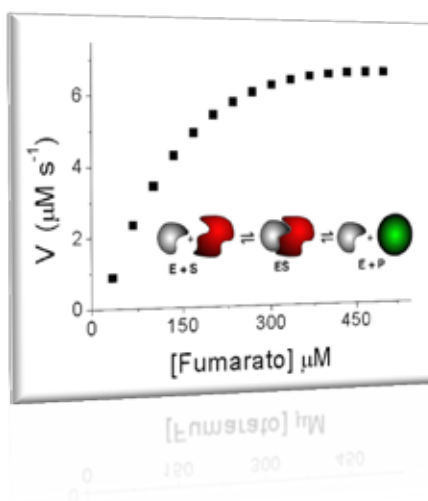
Após esta etapa, a fração 8 contendo a enzima His₆-TcGAPDH foi dialisada em tampão TEA 100 mM, EDTA 1 mM e β- mercaptanol 1 mM em pH 7,5. Este tampão é o mesmo em que é realizado o ensaio cinético (conforme descrito no Capítulo 8). A cauda de histidina foi clivada com a enzima trombina para verificar o efeito da atividade devido à presença do his-tag. A determinação da concentração da proteína foi realizada utilizando o método de Bradford.^[7]

6.4. Referências

- [1] NELSON, D. L.; COX, M. M., Biosynthesis of amino acids, nucleotides, and related molecules. In: NELSON, D. L.; COX, M. M. (Eds.). **Lehninger – principles of biochemistry**. 4. ed. New York: W. H. Freeman, 2004. p. 862-880.
- [2] ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1818-1822, 2004.
- [3] ERLICH, H. A.; GELFAND, D.; SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1643-1651, 1991.
- [4] CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 399, n. 1, p. 13-22, 2010.
- [5] HANNAERT, V., OPPERDOES, F.R., MICHELS, P.A. Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi: Expression in Escherichia coli, purification, and characterization of the enzymes. **Prot. Expres. Purif.**, v.6, n. 3, p. 244-250, 1995.
- [6] BANEYX, F., Recombinant protein expression in Escherichia coli. **Cur. Opin. Biotech.**, v.10, n. 5, p. 411-421, 1999.
- [7] BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

Capítulo 7

TcDHODH: Ensaio cinético e mecanismo de reação

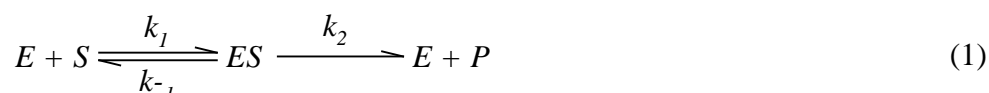


Neste capítulo é feita uma breve introdução sobre a cinética enzimática e a técnica de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC). Em seguida, os resultados dos parâmetros cinéticos para os substratos DHO e FUM, assim como dos parâmetros de ativação da reação catalisada pela enzima TcDHODH.

7. TcDHODH: ENSAIO CINÉTICO E MECANISMO DE REAÇÃO

7.1. Catálise Enzimática

Em 1902 Brown forneceu uma explicação qualitativa para as observações da dependência da velocidade da reação em relação ao substrato ^[1], descrita pelo seguinte esquema:



Os termos k_1 , k_{-1} e k_2 são as constantes, para a associação da enzima com o substrato, sua dissociação e a formação do produto.

O tratamento matemático foi feito primeiramente por Henri (1903) e subsequentemente por Michaelis e Menten (1913). Em 1894, Emil Fischer propôs o modelo chave – fechadura para explicar a ação enzimática, um modelo em que a estrutura da enzima e do substrato são rígidas. ^[2] Já no modelo proposto por Koshland ^[3] em 1958, tanto a enzima quanto o substrato passam por mudanças de conformação para propiciar o encaixe. A enzima não aceita simplesmente o substrato, o substrato é distorcido para conformação exata do estado de transição, denominado encaixe flexível.

O modelo matemático de Michaelis-Menten se baseava na suposição de que a enzima e seu substrato se associavam reversivelmente para formar um complexo enzima substrato (ES), como mostrado no esquema proposto por Brown ^[4]. Assume-se que essa associação/dissociação atinge um equilíbrio de forma muito rápida, e K_s é a *constante de dissociação enzima-substrato*. No equilíbrio,

$$k_{-1}[ES] = k_1[E][S] \quad (2)$$

$$K_s = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (3)$$

As interpretações de Michaelis-Menten foram refinadas e ampliadas por Briggs e Haldane em 1925, diferentemente do modelo de Michaelis-Menten que assumia um estado de equilíbrio entre a enzima e substrato livres com a forma complexada, o novo modelo assumia que a concentração do complexo ES atinge um valor constante num sistema dinâmico. ^[4] Isto é, ES é formado tão rapidamente a partir de E+S na mesma proporção em que ele desaparece a partir de duas maneiras: dissociando-se para regenerar E+S ou através da reação para formar E+P. Esta suposição é definida *aproximação do estado estacionário*, sendo expressa como

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0 \quad (4)$$

Este conceito não alterou o modelo matemático de Michaelis-Menten que pode ser obtido usando a aproximação do estado estacionário para obter a *equação de Michaelis-Menten* ^[4] Equação 5. Esta descreve a velocidade da reação como uma função hiperbólica da [S], Figura 7.1. A concentração de substrato que fornece uma velocidade de reação igual à metade da velocidade máxima, obtida sob condições de saturação pelo substrato, foi definida como K_M (constante de Michaelis) ^[4].

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (5)$$

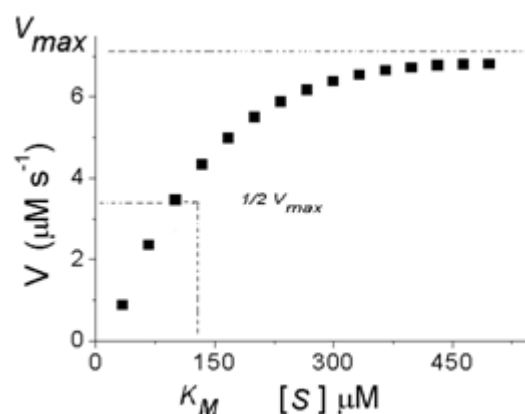


Figura 7.1. Velocidade da reação versus a concentração do substrato para uma reação catalisada por uma enzima. Curva hipérbola retangular e obedece a equação de Michaelis-Menten. Figura adaptada. [8]

O valor de K_M representa a concentração de substrato na qual metade dos sítios ativos da enzima na amostra está ocupada por moléculas de substrato no estado estacionário. [67] Em condições específicas onde $k_2 \ll k_{-1}$ as constantes K_M e K_s (constante de dissociação) são equivalentes. Nesse caso, apesar de K_M ser uma constante cinética, pode ser considerado como uma medida relativa da afinidade de ligação do substrato.

7.2. Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC)

7.2.1. Calorimetria no estudo da cinética enzimática

A caracterização termodinâmica de interações e/ou reações é importante para o entendimento do comportamento de biomoléculas, sendo essencial para o planejamento de novos fármacos. As principais aplicações da ITC são no estudo de interações não-covalentes entre cadeias poliméricas, equilíbrios de dissociação de aminoácidos em diferentes estados de protonação, estudos termodinâmicos de detergentes e a formação de micelas, interações entre macromoléculas e ligantes e estudos cinético enzimáticos.

[5]

Este método consiste na adição do titulante, através de uma micro-pipeta automática, sobre o titulado que se encontra em uma cela de amostra (Figura 7.2). Em um experimento típico de cinética enzimática, a enzima é colocada na cela de amostra e titulada com o substrato.

A maioria dos calorímetros mede os efeitos diferenciais do calor entre a cela de referência (preenchida com tampão ou água) e a cela de amostra (ou cela de reação) e trabalha com base no sistema de compensação de calor. [6] A diferença de temperatura entre as duas celas é constantemente monitorada e uma energia constante (definida pelo usuário) é aplicada na cela de referência, a qual ativa o circuito de retorno para aplicar uma quantidade de energia variável sobre a cela de amostra para manter uma diferença de temperatura entre as duas celas próxima de zero (Figura 7.2).

Quando a reação ocorre, há uma alteração da temperatura na cela de amostra, o que leva a uma diferença de temperatura entre as duas celas. Isto é detectado pelo calorímetro e a energia aplicada na cela de amostra é ajustada. O sinal observado num experimento calorimétrico é a energia fornecida a esta cela. [6]

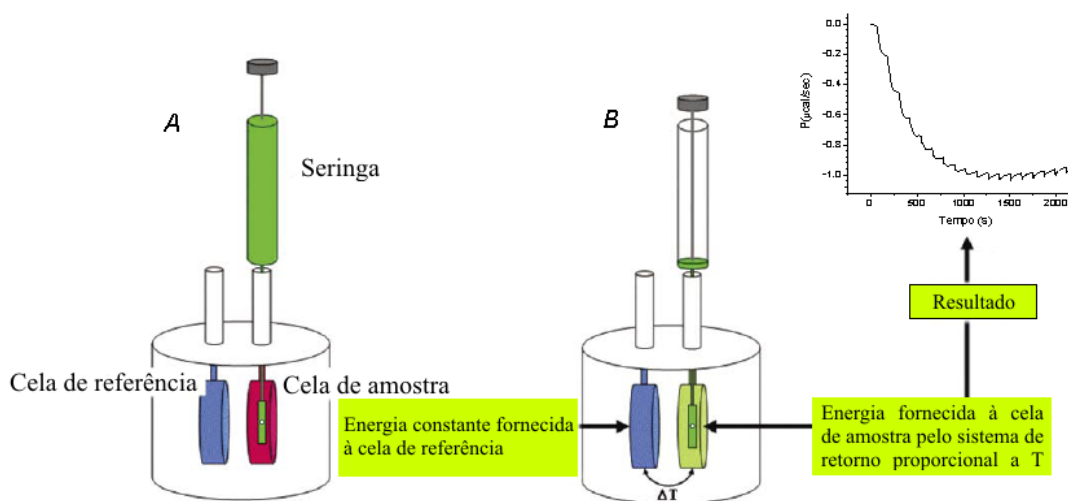


Figura 7.2. Esquema representativo de um Calorímetro de Titulação Isotérmica (ITC): (a) Cela de referência e de amostra; (b) Durante o experimento, quando inicia-se a injeção, ocorre uma variação na temperatura da cela de amostra. A diferença de temperatura entre as celas (ΔT) é compensada pelo equipamento, gerando assim um termograma. Figura adaptada. [7]

Através da ITC é possível acompanhar a velocidade de reação em sistemas enzimáticos. Todd e Gomez ^[6] demonstraram que a quantidade de energia ou potência térmica (E) produzida pela reação é proporcional ao calor (Q) trocado pelo sistema, seja exotérmico ou endotérmico.

$$E = \frac{dQ}{dt} \quad (6)$$

Uma reação química termodinamicamente favorável é espontânea desde que haja uma diminuição da energia livre, que é a soma dos termos entálpico e entrópico ($DG = DH - TDS$). O componente entálpico é observado como *calor* (em condições de pressão constante). ^[15] A quantidade de calor associado na conversão de *n* moles de substrato em produto é dada por

$$Q = n\Delta H_{app} = [P]_{total}V\Delta H_{app} \quad (7)$$

Sendo DH_{app} a entalpia molar aparente, V o volume da solução na cela de amostra, [P] a concentração molar do produto. Sendo a potência térmica proporcional à taxa de produto gerado pela reação, tem-se:

$$E = \frac{dQ}{dt} = \frac{d[P]}{dt}V\Delta H_{app} \quad (8)$$

Rearranjando a Equação 8, onde $d[P]/dt$ é igual à velocidade de formação do produto ou consumo do substrato:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V\Delta H_{app}} \frac{dQ}{dt} \quad (9)$$

Sistemas enzimáticos que necessitam mais de um substrato, deve ser realizada sob as condições de pseudo-primeira ordem com relação a um dos substratos. Para a determinação da velocidade, na Equação 9, precisa-se determinar o valor de dQ/dt , fluxo de calor da reação, medida da diferença da linha base original e nova linha base após cada injeção, Figura 7.3 (em destaque). Após a injeção do substrato, a linha base se estabiliza numa potência térmica menor que a observada antes da injeção; isso porque ocorre geração de calor pela reação enzimática e há a compensação desta energia pelo instrumento, para manter o equilíbrio térmico entre as celas de referência e amostra. Assim, cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior.

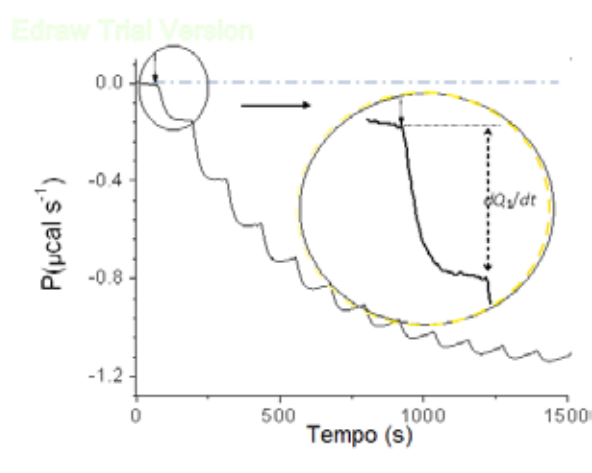


Figura 7.3. Curva típica de cinética enzimática no ITC: potência térmica versus o tempo. A cada injeção a linha base se estabiliza num nível inferior (em destaque, amarelo) e a quantidade de calor gerado é proporcional à velocidade da reação. Figura adaptada. ^[8]

Um parâmetro essencial para a determinação da velocidade é a entalpia aparente de reação, determinada nas condições experimentais. A determinação da DH_{app} exige suficiente enzima para converter todo o substrato a produto em um determinado período de tempo, em uma injeção única. A integração da área obtida fornece a quantidade total de calor (Q_r) gerado na reação, Equação 10.

$$\Delta H_{app} = \frac{1}{[S]_{total}V} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt} dt \quad (10)$$

Na ITC há dois métodos de realização de experimentos: o método das injeções múltiplas (*MIM*, *multiple injection method*) e injeção simples (*SIM*, *single injection method*), para uma aplicação tanto para as análises termodinâmicas de interação quanto cinéticas. No *MIM* são feitas várias injeções da solução do substrato (que está na seringa) na cela de amostra e após cada injeção, há um tempo que deve ser suficiente para que a linha base se estabilize em um novo nível de potência térmica. Neste tempo (de 60 a 120 s) não mais que 5% do substrato deve ser consumido antes da próxima injeção para que se obtenha o estado estacionário, assim, a concentração de substrato usada no experimento deve ser muito maior que a concentração da enzima. O método *SIM*, que se inicia após uma única injeção do substrato (em concentrações muito acima do valor de K_M para garantir a saturação da enzima) e se acompanha continuamente da velocidade da reação até o consumo total do substrato. ^[9]

A vantagem do *MIM* em relação ao *SIM* é a baixa quantidade de produto formado durante o experimento em relação à quantidade de substrato na cela de amostra, pois esse aumenta a cada injeção. Desta maneira, a inibição da reação pelo produto não causa uma influência significativa nas medidas.

7.3. Materiais

7.3.1. Ensaio cinético da TcDHODH

DHO, ácido orótico (orotato ou ORO), ácido fumárico (fumarato ou FUM), Trizma base e fosfato de sódio dibásico e monobásico foram comprados da Sigma–Aldrich. Cloreto de sódio da Fluka.

7.3.2. Ensaio cinético da His₆-GAPDH

Os reagentes trietanolamina (TEA), D,L-gliceraldeído-3-fosfato (G3P), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), b-mercaptoetanol, arseniato de sódio (NaHAsO₄.7H₂O), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

7.4. Procedimento Experimental

Todos os experimentos de Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC) foram realizados num calorímetro VP-ITC da Microcal (Northampton, MA). A degaseificação e termostatização de todas as soluções (reagentes e soluções tampões utilizadas para a lavagem da cela de amostra) foram realizadas de 10 a 20 minutos, através da bomba de vácuo contida no aparelho *ThermoVac* para evitar a formação de bolhas durante o experimento.

Preencheu-se a cela de referência com uma seringa do tipo livre de gás (“*gastight*”- Hamilton). A solução foi então lentamente injetada para evitar a formação de bolhas. Para o preenchimento da cela sempre era preparado 2 mL de solução, pois a cela do calorímetro em um volume de 1,427 mL (especificação do fabricante), já para o preenchimento da seringa, uma quantidade menor era preparado devido ao seu volume de 284,21 mL (especificação do fabricante).

Ao se iniciar os experimentos, é requerido um tempo para a estabilização da temperatura (± 5 minutos). Em seguida, o aparelho começa a estabilizar a linha base que dura em torno de 15 minutos. Após o período de equilibração preliminar, um tempo adicional de 60 s foi estabelecido para se gerar a linha base usada na análise. Em todos os experimentos a velocidade de rotação da seringa foi de 307 rpm e a temperatura do

experimento foi de 25°C. A potência térmica (mcal s^{-1}) foi registrada como uma função do tempo. Os dados foram coletados pelo *Software VPViewer* a cada 2 segundos.

7.4.1. Determinação da entalpia aparente da reação catalisada pela enzima DHODH

A determinação da entalpia aparente (ΔH_{app}) de conversão do substrato diidroorotato (DHO) para orotato (ORO) pela TcDHODH foi determinada preenchendo a cela com 1,6 mM fumarato (em excesso) e 300 nM TcDHODH. Preecheu-se a seringa com o substrato 3 mM DHO. Utilizou-se o método *SIM*, com o volume injetado de 10 μL , onde se registraram os dados experimentais por um período de 1200 s, intervalo de tempo que ocorreu a reação.

Na determinação do ΔH_{app} do substrato fumarato (FUM) convertido em succinato (SUC), preencheu-se a seringa com 16 mM fumarato e a cela com DHO 4 mM e enzima 300 nM TcDHODH. Realizou-se injeção única de 10 μL com um intervalo 1200 s. A integração da área da curva corresponde à troca de calor da reação, pois o experimento é feito a pressão e volume constante. Em todos os ensaios as soluções estão em tampão Tris 20 mM, 150 mM NaCl pH 8,0.

As diluições dos substratos foram determinadas nas mesmas condições descritas na determinação do ΔH_{app} . Os ensaios também foram realizados em solução tampão fosfato de sódio 100 mM em pH 8,0 para verificação do efeito de ionização do tampão na determinação de ΔH_{app} .

7.4.2. Determinação dos parâmetros cinéticos da enzima TcDHODH

A determinação das curvas cinéticas foi realizada preenchendo-se a seringa com 3 mM DHO e a cela com 1,6 mM FUM e 50 nM TcDHODH. Foram 20 injeções de 1

μL , com intervalo de 60 s. Nestas condições garante-se a cinética de pseudo-primeira ordem com relação ao DHO.

Na cinética de reação para o substrato FUM a seringa foi preenchida com o 16 mM FUM e na cela 4 mM DHO e 300 nM TcDHODH. Foram 15 injeções de 3 μL com intervalo de 120 s em tampão Tris 20 mM, 150 mM NaCl pH 8,0.

7.4.3. Cinética da enzima TcDHODH pelo método Espectrofotométrico UV-VIS

O ensaio da enzima TcDHODH é convencionalmente feito utilizando-se métodos espectrofotométricos. Para comparação dos dados obtidos por ITC, foram realizados os ensaios de pseudo-primeira-ordem com relação ao substrato DHO (variando de 10 to 50 μM), 50 nM de TcDHODH e FUM em excesso (1,6 mM). O ensaio para o substrato FUM (variando a concentração de 100 a 400 μM), 4 mM DHO, e 300 nM TcDHODH. A reação iniciou-se com adição da enzima. A curva cinética foi obtida medindo a formação do orotato a 300 nm, e o coeficiente de extinção molar usado foi de $2650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.4.4. Determinação dos Parâmetros Cinéticos de Ativação da enzima TcDHODH

A determinação dos parâmetros cinéticos de ativação da enzima TcDHODH para os substratos FUM e DHO foi realizado nas diferentes temperaturas: 20, 25, 30 e 37°C nas condições experimentais descritas em na Seção 7.3.3.

7.4.5. Verificação da atividade enzimática utilizando o cossolvente DMSO e o surfactante Triton X-100

A atividade da enzima foi avaliada na presença de diferentes concentrações do cossolvente dimetilsulfóxido (DMSO) (0 a 10 % v/v) e do surfactante Triton X-100 (0 a 0,5%). Estas concentrações foram escolhidas com base nas proporções v/v descritos na

literatura, utilizados nos ensaios *in vivo*, para aumentar a solubilidade de substâncias com baixa solubilidade em água e para evitar a agregação das moléculas, respectivamente.

7.4.6. Cinética da enzima LmDHODH por ITC

Como as enzimas TcDHODH e LmDHODH têm algo grau de identidade e similaridade, foi determinado o DH_{app} da LmDHODH e a cinética enzimática por ITC nas mesmas condições descritas na seção 7.3.1 e 7.3.2 (descritos para a TcDHODH), mas na presença da LmDHODH.

7.4.7. Cinética da enzima TcGAPDH pelo método Espectrofotométrico UV-VIS

No ensaio cinético, utilizou-se a concentração do substrato NAD^+ em excesso (1,5 mM) e concentrações crescentes de G3P (1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 nM); acompanhou-se a formação do NADH, no comprimento de onda 340 nm.

Utilizando-se da lei de Lambert -Beer, $A = \epsilon bc$ (sendo A absorvância em 340 nm, ϵ a absorvância molar do NADH de $6.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 340 nm, b o caminho ótico sendo igual a 1 e c a concentração do G3P), transformou-se os valores determinados de absorvância em concentração de G3P. Em seguida, analisou-se os dados com o módulo de cinética enzimática do Programa *SigmaPlot*. Os parâmetros cinéticos foram calculados através de regressão não linear.

7.4.8. Análise dos dados

Todos os experimentos nesse trabalho foram realizados ao menos em duplicata. Os dados referentes à concentração do substrato, $[S]$, e a velocidade da reação, v , foram obtidos usando o programa Origin 7.0 ^[10] através do modo “*Ensaio Enzimático*” desse programa de acordo com o “método 2: somente substrato”. Esse método é usado quando

o experimento é realizado através de múltiplas injeções. Os dados obtidos foram exportados do programa *Origin* para o programa *SigmaPlot 10.0.1*^[11] e as constantes cinéticas determinadas a partir, através do ajuste não-linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten.

7.5. Resultados e Discussão

7.5.1. Determinação da entalpia aparente da reação para a enzima TcDHODH

A determinação da ΔH_{app} de reação catalisada pela TcDHODH foi realizada colocando um dos substratos na seringa como reagente limitante da reação (DHO e FUM). Assim que o substrato foi adicionado na solução à reação se iniciou, ocorrendo uma deflexão da linha base, evidenciando que a reação é exotérmica. A curva em azul refere-se diluição do DHO.

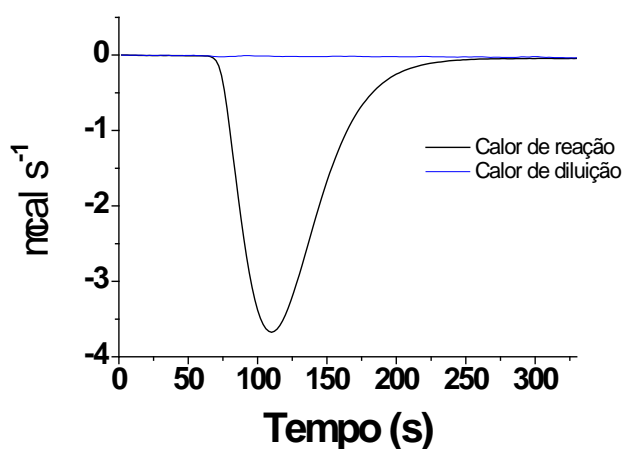


Figura 7.4. Determinação do ΔH_{app} de reação. Curva típica de processo exotérmico. A curva em azul refere-se à determinação do calor de diluição do DHO.

A curva mostrada na Figura 7.4 é a determinação direta do calor trocado durante a reação e a área sob a curva corresponde a todas as trocas de calor que ocorrem na cela durante a reação. O término da reação ocorre quando a linha base retorna ao patamar inicial. O ΔH_{app} foi determinado subtraindo o calor de diluição (linha azul) da troca de calor total envolvida no processo:

$$Q_{app} = \frac{Q_r - Q_d}{n} \quad (11)$$

onde, Q_r é o calor de reação, Q_d é o calor de diluição do substrato e n é o número de moles do reagente limitante. O experimento é realizado a pressão constante, as variações de volume são desprezíveis, desta forma o calor molar aparente (Q_{app}) de reação pode ser considerado igual à entalpia molar aparente de reação (DH_{app}).

Na Figura 7.4 é observado as baixas trocas de calor de diluição do substrato DHO (menos de $0,01 \mu\text{cal s}^{-1}$). A entalpia aparente para a reação foi determinada com relação aos dois substratos, obtendo-se essencialmente os mesmos valores de $DH_{app} -11,6 \pm 1,78 \text{ kcal mol}^{-1}$ (média de três medidas independentes).

Sendo a ΔH_{app} registrada pelo calorímetro a soma das entalpias intrínseca de reação e da ionização do tampão, esta deve ser determinada em tampões com entalpias de ionização distintas¹² para verificar se há troca de prótons da reação com o tampão:

$$DH_{app} = DH_{int} + n \times DH_{ion} \quad (12)$$

Onde ΔH_{app} representa a entalpia observada no experimento, ΔH_{int} a entalpia intrínseca de reação da enzima, ΔH_{ion} a entalpia de ionização do tampão, e n o número de prótons trocados com o tampão. Para obtenção de ΔH_{int} , ajusta-se linearmente a ΔH_{ion} reportada na literatura (eixo x) versus a ΔH_{app} (eixo y). O ponto zero da abscissa será ΔH_{int} e o coeficiente da reta será o número de prótons trocados com o tampão.^[12]

A reação da enzima TcDHODH foi realizada, nas mesmas condições descritas para o tampão Triz, mas na presença do tampão fosfato de sódio para verificação do efeito de ionização do tampão. Os resultados mostraram que não há a troca de prótons entre os tampões e a reação, pois não houve mudança no valor da ΔH_{app} .

7.5.2. Determinação dos parâmetros cinéticos para a enzima TcDHODH

Após a determinação da entalpia aparente de reação, realizou-se o estudo da cinética enzimática através do método *MIM*. A dependência da velocidade da reação como função da concentração do substrato é avaliada pela cinética de Michaelis-Menten, cujos parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_M são obtidos por ajuste não-linear. A determinação da cinética enzimática de pseudo-primeira ordem com relação ao substrato FUM e DHO estão nas Figura 7.5 e 7.6 respectivamente.

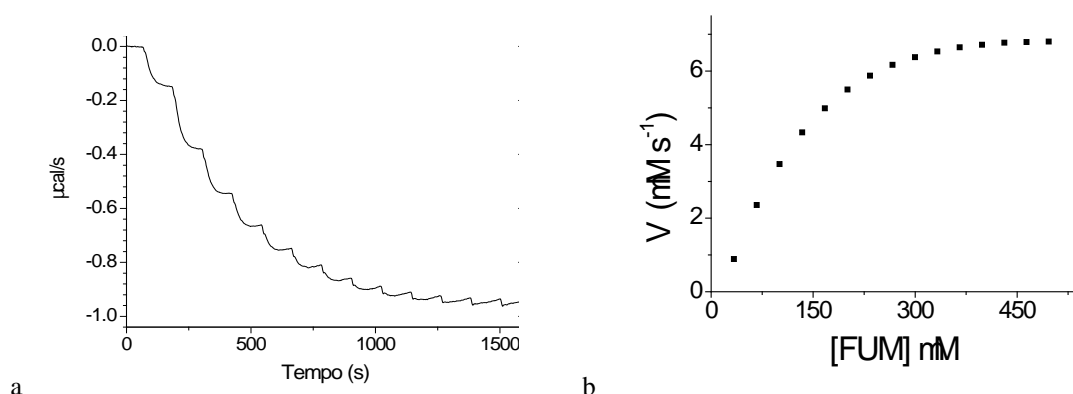


Figura 7.5. Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima TcDHODH para determinar as constantes cinéticas do FUM. a) Curva gerada pelo ITC da troca de calor da reação (μcal) em função do tempo (s). b) Substrato FUM $K_M = 120 \pm 9,0 \text{ mM}$ e $V_{\text{max}} = 6,7 \pm 0,1 \mu\text{M s}^{-1}$. Parâmetros gerados a partir da média de três medidas independentes.

Na Figura 7.5 observa-se o completo ensaio calorimétrico da enzima TcDHODH na presença do substrato FUM. Após a estabilização da linha base, verifica-se uma inflexão desta até a sua nova estabilização em um nível inferior. Esse decréscimo da potência térmica fornecida pelo instrumento indica que a reação de conversão substrato em produto é exotérmica. Esse processo é repetido nas próximas injeções, até que a enzima fique totalmente saturada com o substrato (a partir da 9ª injeção).

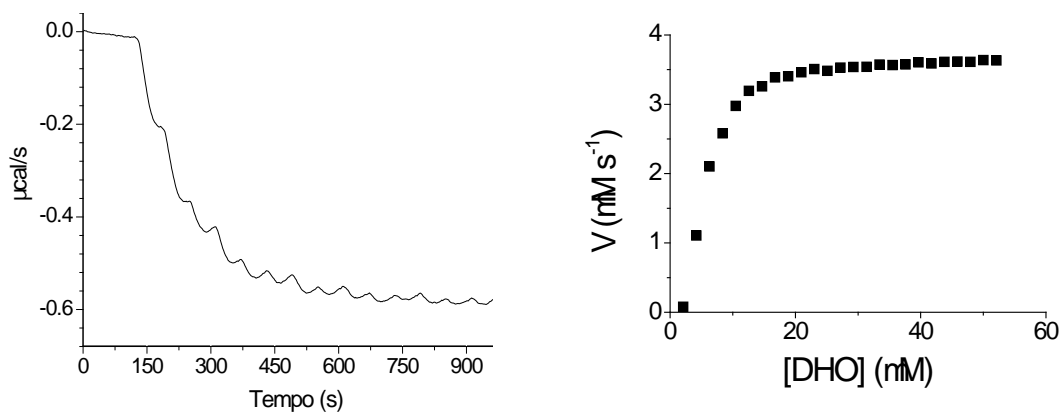


Figura 7.6. Curva obtida no ensaio calorimétrico da enzima TcDHODH para determinar as constantes cinéticas do DHO. a) Curva gerada pelo ITC da troca de calor da reação (μcal) em função do tempo (s). b) Substrato DHO $K_M = 8,56 \pm 2,6 \text{ mM}$ e $V_{\text{max}} = 4,1 \pm 0,7 \mu\text{M s}^{-1}$. Parâmetros gerados a partir da média de três medidas independentes.

A velocidade da reação foi obtida a partir da integração da área sob os picos do gráfico da potência térmica *versus* o tempo (Figura 7.5a), medindo-se a diferença entre a linha base original e a nova linha base após a adição do substrato. O ponto relativo à primeira injeção foi excluído, uma vez que é conhecida a dificuldade em obter valores reprodutíveis nos experimentos de ITC. Uma série de três experimentos foi realizada para se obter as constantes cinéticas.

Os dados foram ajustados à curva de Michaelis-Menten (Equação 5) através da regressão não linear dos mínimos quadrados usando o programa *SigmaPlot* (Tabelas 7.1 e 7.2). Em um primeiro momento a reação obedece a cinética de primeira ordem, com o aumento da concentração do substrato a cinética da reação passa a ser ordem zero, etapa em que o sítio ativo das enzimas em solução está ocupado.

Os substratos DHO e FUM tiveram os valores das constantes de Michaelis calculadas, $8,6 \pm 2,6 \mu\text{M}$ e $120 \pm 9,0 \mu\text{M}$, respectivamente. Sendo que K_M pode ser considerado uma medida aproximada da afinidade da enzima pelo substrato, podemos inferir que o substrato DHO interage mais efetivamente com a enzima do que o substrato FUM. A Tabela 7.1 apresenta a comparação dos parâmetros cinéticos

determinadas por ITC e por UV-Vis para as DHODHs da Classe 1A. Em cinza estão apresentados os parâmetros determinados neste trabalho, os quais mostram corroborar.

Tabela 7.1. Comparação dos valores de K_M para a Classe 1A

Espécies	DHO (μM)	FUM (μM)	Método
<i>T. cruzi</i>	8,56 \pm 2,6	120 \pm 9,0	ITC
	12,9 \pm 5,4	147 \pm 17	UV
<i>Leishmania major</i> Friedlin ^a	57,9	143	UV
<i>T. brucei</i> ^b	14,0	80,0	UV
<i>Lactococcus lactis</i> ^c	35,0 \pm 2	ND	UV
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ^d	16,0 \pm 5	115 \pm 5,0	UV

ND= Não determinada

^a Ensaio acompanhado a formação do ORO a 300 nm ($\epsilon = 2.65 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) contendo 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM KCl a 25 °C^[13].

^b Ensaio em 50 mM HEPES, pH 8,0, 150 mM NaCl, 10% glicerol a 25 °C na presença de 500 mM FUM e 250 mM DHO^[14].

^c Ensaio acompanhado a formação do ORO em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5 a 37°C^[15].

^d Ensaio acompanhado a formação do ORO com 1,0 mM DHO e 1,0 mM FUM em tampão 50 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, pH 8,0 a 30 °C^[16].

7.5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos para a enzima TcDHODH na presença do cossolvente DMSO e do surfactante Triton X-100

Para serem farmacologicamente ativos, os inibidores enzimáticos devem apresentar certas propriedades físico-químicas que incluem certo grau de lipofilia da molécula. O trabalho descrito por *Lipinski*^[17] chama a atenção para o fato de que um fármaco tem sua absorção limitada por sua solubilidade em água quando administrado por via oral: quanto maior a solubilidade do composto menor a absorção. Por outro lado, moléculas insolúveis em água não podem ser administradas oralmente.

Apesar da facilidade de permeação através das membranas celulares, as concentrações destas substâncias disponíveis para a absorção não atinge quantidades suficientes para a resposta terapêutica. Deste modo, são desejáveis candidatos que possuam um balanço entre características hidrofílicas e hidrofóbicas, garantindo um mínimo de solubilidade em água e permeabilidade nas membranas celulares.^[17] Desse

modo, as substâncias orgânicas em geral possuem baixa solubilidade em água. Para que moléculas deste tipo sejam testadas, usualmente é preparada uma solução estoque da substância em um solvente orgânico aprótico. Um dos cossolventes apróticos mais usado é o dimetilsulfóxido (DMSO), pois a maioria das substâncias é facilmente dissolvida na presença desta substância permitindo a realização dos experimentos de inibição enzimática. O comportamento de cada enzima frente à adição de cossolventes pode variar, sendo que a determinação dos efeitos da sua concentração na atividade da enzima é uma etapa importante no desenvolvimento de um protocolo visando o ensaio de inibidores enzimáticos.

Assim, a atividade da TcDHODH e a determinação da ΔH_{app} foi estudada na presença do cossolvente DMSO (0; 2,5; 5; 7,5 e 10% v/v) e do surfactante Triton X-100 (0,01; 0,1 e 0,5 % v/v). O Triton foi incluído nos estudos para evitar a agregação das substâncias e desta forma evitar falso-positivos nos ensaios bioquímicos.

Não houve mudança significativa na atividade da enzima com a adição de até 0,1% v/v de Triton e 7,5 % de DMSO, provavelmente devido à dificuldade das moléculas em acessarem o sítio ativo, pois a enzima TcDHODH é estruturalmente organizada devido ao enovelamento α/β barril, onde o domínio catalítico é localizado na parte interna, onde várias fitas formam o bolso de ligação dos substratos. A enzima TcDHODH tem uma pequena alteração nos parâmetros cinéticos apenas na presença de 10% de DMSO e 0,5 % de Triton, como descritos na Tabela 7.2. O experimento controle é na ausência de cossolventes.

Tabela 7.2. Entalpia de reação (ΔH_{app}), constante de Michaelis (K_M), velocidade máxima (V_{max}) e eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) para pseudo-primeira ordem com relação ao substrato FUM

Parâmetros ^[a]	Controle	10,0% v/v DMSO	0,5 % v/v Triton
ΔH_{app} (kcal mol ⁻¹)	-11,64 ± 0,49	-10,73 ± 0,37	-10,81 ± 0,30
k_{cat} (s ⁻¹)	20,5	16,5	13,6
V_{max} (μM s ⁻¹)	6,16 ± 0,15	4,94 ± 0,10	4,04 ± 0,24
K_M (mM)	120 ± 9	110 ± 7,4	84,7 ± 9,3
k_{cat}/K_M (10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)	171	150	160

^[a] Parâmetros cinéticos determinados como mostrado na Figura 7.5 b para o substrato FUM.

Os resultados da Tabela 7.2 sugerem que a afinidade da enzima pelo substrato aumentou na presença do cossolvente, sugerindo que o Triton e o DMSO em concentrações de 0,5 % e 10% respectivamente, provocam mudanças conformacionais na enzima de forma a alterar a sua afinidade pelo FUM. Possivelmente a sua presença promoveu uma saída das moléculas de água da superfície da enzima na entrada do sítio ativo, facilitando o encontro da enzima com o substrato. A constante catalítica (k_{cat}) e a velocidade máxima (V_{max}) diminuíram. As concentrações escolhidas para os ensaios das substâncias foram as que não alteraram os parâmetros cinéticos com relação ao experimento controle; de 5% de DMSO e 0,1% de Triton.

7.5.4. Determinação da inibição pelo produto de reação para a enzima TcDHODH

Os ensaios para a verificação da inibição da enzima do produto da reação (ORO) são mostrados na Figura 7.7.

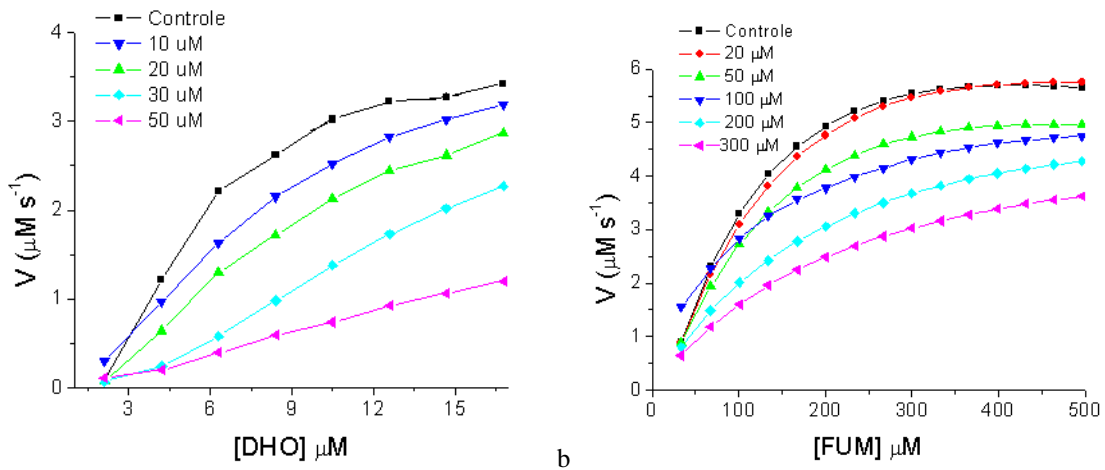


Figura 7.7. Ensaios cinéticos na presença do inibidor. O experimento controle é mostrado na curva em preto. (a) Substrato DHO. Variação de ORO na cela: 5, 10, 20, 30 e 50 μM . $K_i^{app} = 72,21 \pm 7,41 \mu\text{M}$ (b) Substrato FUM. Variação da concentração do ORO na cela: 20, 50, 100, 200 e 300 μM . $K_i^{app} = 110 \pm 6,6 \mu\text{M}$.

O produto de reação, ORO, tem baixa afinidade pela enzima TcDHODH, com mecanismo de inibição competitiva com relação a ambos substratos. Este é um modelo típico de regulação enzimática conhecida por "*feed-back*", onde o próprio produto da reação atua como modulador da enzima que a catalisa, para controle da via. Esta substância foi estabelecida como inibidor padrão na busca de novos inibidores contra a enzima TcDHODH.

7.5.5. Estudo do mecanismo de reação e dos parâmetros termodinâmicos de ativação da enzima TcDHODH

A enzima DHODH proveniente de diferentes organismos apresenta o mecanismo de reação do tipo *ping-pong*. Esta informação motivou a verificação deste mecanismo também para a enzima TcDHODH, Figura 7.8.

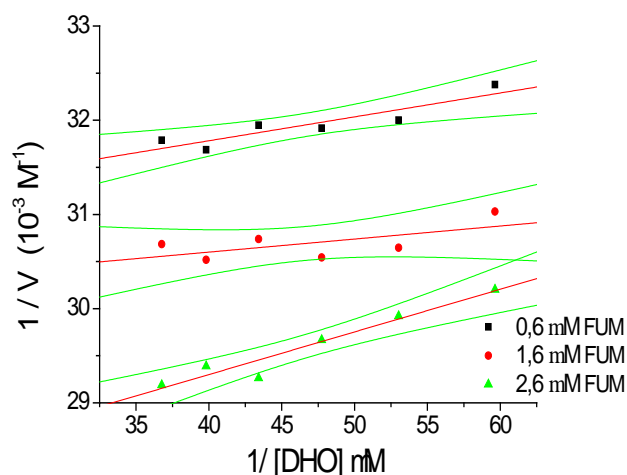
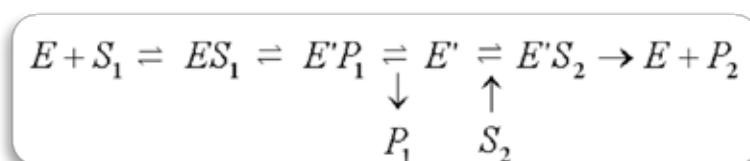


Figura 7.8. Ensaio cinético para a determinação do mecanismo Ping-Pong. Pseudo-primeira ordem com relação ao substrato DHO com diferentes concentrações do FUM.

O comportamento observado de retas paralelas na Figura 7.8 sugere que o mecanismo pelo qual a TcDHODH opera é do tipo *ping-pong*. Para a compreensão deste mecanismo, uma representação esquemática está ilustrada abaixo:



O substrato DHO (S_1) interage com a enzima TcDHODH (E), forma o complexo enzima-DHO [ES_1] seguido do complexo enzima/ORO ou enzima-produto ($E'P_1$) para posterior liberação do produto (P_1). A enzima passa a um estado intermediário (E'), devido a transferência de um hidrogênio ao sítio ativo da enzima, etapa de redução da FMN. Apenas quando o substrato DHO já foi liberado do sítio ativo, agora na forma de orotato, a enzima interage com o segundo substrato, FUM (S_2), é reduzido a succinato (P_2), devido a transferência de próton da flavina reduzida que passa a flavina oxidada.

Para que a reação ocorra, as moléculas envolvidas na reação devem colidir com orientação correta e energia suficiente (*energia de ativação*, E_a) para que transponham o estado de transição (ponto de mais alta energia). As moléculas devem se aproximar o suficiente para que a atração entre elas provoque um rearranjo e a formação de ligações que estabilizem o sistema.

No estado de transição há ligações sendo rompidas e formadas com a possibilidade de formar produtos ou retornar ao estado inicial de reagente. Na presença da enzima, aumenta-se a probabilidade do estado de transição ser formado. O estado de transição dura uma fração de picosegundos.^[18]

Os parâmetros termodinâmicos do estado de transição estão relacionados com a diferença entre o estado inicial da formação do complexo enzima/substrato (ES) e o estado ativado (ES^\ddagger) para um equilíbrio hipotético. Esta teoria contém uma série de simplificações para descrever este fenômeno complexo de reação enzimático múltiplo substrato, mas a compreensão dos parâmetros termodinâmicos pode ser útil no estudo de análogos do estado de transição na busca de inibidores enzimáticos, assim como na elucidação do mecanismo de reação.

A elucidação termodinâmica do processo de catálise, no estado de transição, foi realizada determinando os parâmetros termodinâmicos do estado de transição (ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger e ΔS^\ddagger). Para a determinação destes parâmetros, construiu-se a curva de Arrhenius em diferentes temperaturas (20, 25, 30 e 37 °C). A energia de ativação (E_a) foi calculada determinando a inclinação da curva de Arrhenius (E_a/R). Através dos valores da E_a , os parâmetros termodinâmicos foram calculados de acordo com as seguintes equações [19,20].

$$DH^{\dagger} = E_a - RT \quad (13)$$

$$DG^{\dagger} = E_a - RT - TDS^{\dagger} = DH^{\dagger} - TDS^{\dagger} \quad (14)$$

$$DS^{\dagger} = (DH^{\dagger} - DG^{\dagger})/T \quad (15)$$

O valor da E_a determinado para o FUM foi de $6,0 \pm 0,3$ kcal mol⁻¹ e para o DHO $3,0 \pm 0,8$ kcal mol⁻¹. A obtenção de uma relação linear no tratamento de Arrhenius indica que o mecanismo de reação não muda em função da temperatura. Os demais parâmetros, como variação da energia livre (DG^{\dagger}), entropia (TDS^{\dagger}) e entalpia de ativação (DH^{\dagger}), calculado pelas Equações 13, 14 e 15 estão representadas na Tabela 7.3.

Tabela 7.3. Parâmetros termodinâmicos de ativação para a reação catalisada pela enzima TcDHODH

Parâmetros	FUM	DHO
$k_{cat}(s^{-1})$	$20,5 \pm 1,6$	$45,0 \pm 1,4$
$DG^{\dagger}_{25^{\circ}C}$ (kcal mol ⁻¹)	$15,6 \pm 0,1$	$15,2 \pm 0,1$
$D DG^{\dagger}$	0,4	0
E_a (kcal mol ⁻¹)	$6,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,8$
DE_a	3,0	0
$DH^{\dagger}_{25^{\circ}C}$ (kcal mol ⁻¹)	$5,5 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,8$
$D DH^{\dagger}$	3,1	0
$-TDS^{\dagger}_{25^{\circ}C}$ (kcal mol ⁻¹)	$10,1 \pm 0,2$	$12,8 \pm 0,1$
$-TDDS^{\dagger}$	-2,7	0

^a $D DG^{\dagger}$, DE_a , $D DH^{\dagger}$ e $-TDDS^{\dagger}$ representam a diferença entre cada valor: TcDHODH_{FUM} - TcDHODH_{DHO}

A E_a representa a barreira de energia que deve ser vencida antes que os reagentes se tornem produtos e quanto menor seu valor, maior a velocidade da reação. Desta forma, podemos inferir que a velocidade de catálise do DHO é ligeiramente maior que do FUM.

DG^{\dagger} é maior para a oxidação do DHO do que para a redução do FUM, por 0,40 kcal mol⁻¹, na qual implica dizer que a redução do FUM é a etapa limitante da reação

catalisada pela TcDHODH. ΔH^\ddagger está na mesma ordem de magnitude dos reportados na literatura.^[21] Analisando a estrutura do co-cristal para os substratos (código PDB: 2e68 e 2e6d) podemos ver interações com melhor complementaridade para o complexo TcDHODH/DHO em relação ao TcDHODH/FUM, Figura 7.9.

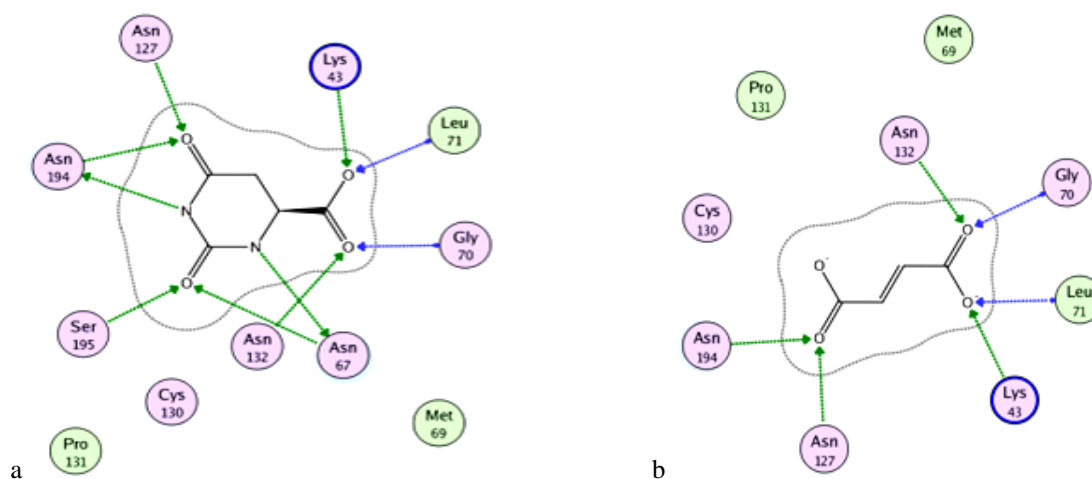


Figura 7.9. Representações bidimensionais das interações das estruturas dos co-cristais da enzima TcDHODH e os substratos: a) DHO e b) FUM. Figura adaptada.^[8]

Os substratos DHO e FUM interagem no mesmo sítio da proteína. FUM tem uma entalpia de ativação mais desfavorável que o DHO ($\Delta\Delta H^\ddagger = 3,1 \text{ kcal mol}^{-1}$) e esta diferença pode ser atribuída ao menor número de ligações de hidrogênio formado no complexo. Há um maior número de interação com os resíduos de Lys, Asn e Ser.

A entalpia de ativação está relacionada com a formação, quebra e torção das ligações dos reagentes envolvidos na reação até chegar ao estado de transição. A entropia de ativação nos dá a informação com relação à correta orientação e conformação dos reagentes até se atingir o estado de transição.

O maior contribuinte para o ΔG^\ddagger é o ΔTDS^\ddagger para ambos os substratos. A entropia desfavorável está associada à diminuição da flexibilidade do sistema, perda de rotação e translação das moléculas de substrato devido à formação do complexo, Figura 7.10.^[22] Outro fator que pode contribuir para a entropia é acessibilidade dos substratos ao sítio

da TcDHODH; durante o processo de interação para a formação do complexo DHO/TcDHODH, há uma grande perda de flexibilidade da alça ativa (que controla a entrada dos substratos no sítio ativo). Na Figura 7.10 é mostrado um esquema ilustrativo do estado de transição para a enzima TcDHODH baseado em informações descritas na literatura e neste trabalho.

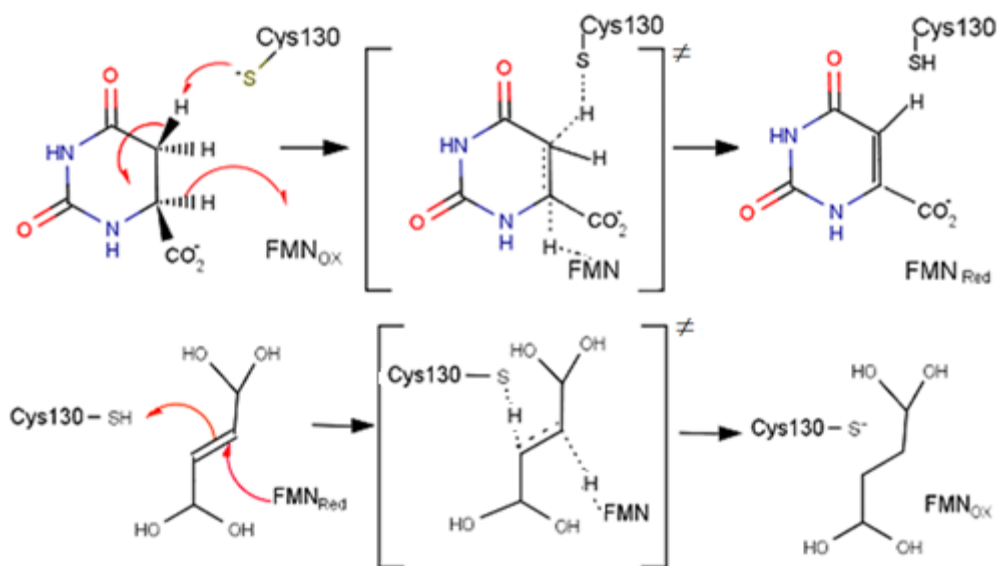


Figura 7.10. Reação catalisada pela enzima TcDHODH para os substratos DHO e FUM. Figura adaptada. [8]

A cisteína catalítica (Cys 130) abstrai um próton do DHO enquanto um hidreto é transferido para a FMN. Nesta etapa o DHO é oxidado para ORO enquanto a FMN_{ox} é reduzido a FMN_{red}. O ORO sai do sítio ativo para a entrada do FUM, segundo o mecanismo *ping-pong*, Figura 7.8. FMN transfere um hidreto para o FUM, convertendo-o a SUC, enquanto um próton é simultaneamente abstraído da Cys130, restabelecendo o ciclo catalítico.

7.5.6. Entalpia de reação e parâmetros cinéticos da enzima LmDHODH

A determinação da ΔH_{app} de reação catalisada pela LmDHODH foi realizada colocando o substrato DHO na seringa, como reagente limitante da reação. Assim que o substrato foi adicionado na solução à reação se iniciou, Figura 7.11.

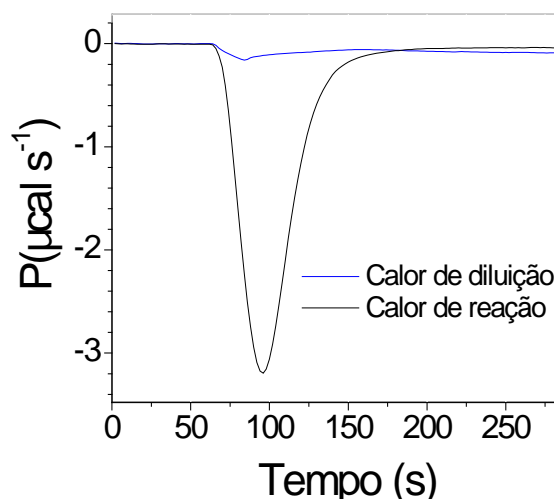


Figura 7.11. Determinação do ΔH_{app} de reação catalisada pela enzima LmDHODH. $\Delta H_{app} -11,01 \pm 0,01$ kcal mol⁻¹.

A entalpia aparente determinada para a reação catalisada pela enzima TcDHODH foi de $\Delta H_{app} -11,60 \pm 1,78$ kcal mol⁻¹ (média de três medidas independentes) e para a reação catalisada pela enzima LmDHODH foi de $-11,01 \pm 1,01$ kcal mol⁻¹, reação exotérmica. Com estes experimentos pode-se observar que a entalpia de reação para a conversão do DHO em ORO e FUM em SUC tem o mesmo valor de entalpia, seja catalisada pela enzima DHODH de *T. cruzi* ou de *Leishmania*. O valor de K_M para o substrato DHO foi de $6,22 \pm 0,47$ μM e a V_{max} $2,5 \pm 0,5$ μM s⁻¹.

7.5.7. Cinética da enzima His₆-TcGAPDH por UV-Vis

Neste trabalho foi realizada a troca de vetores de expressão da enzima GAPDH com o intuito de facilitar o processo de purificação e aumentar o rendimento. Este

objetivo foi alcançado com o estabelecimento do protocolo de expressão descrito neste trabalho. É possível obter a enzima His₆-TcGAPDH estável, na fração solúvel, e pode ser concentrada acima de 20 mg mL⁻¹ sem precipitar, Tabela 7.4.

Tabela 7.4. Purificação da His₆-TcGAPDH

Fração	Volume (mL)	Concentração da proteína* (mg mL ⁻¹)	Proteína total (mg)	Atividade total (μmol min ⁻¹)**	Atividade específica (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Rendimento (%)
Lisado	25	37,84 ± 0,13	946,0	1511 ± 30,5	1,58	100
Após a purificação	15	1,39 ± 0,24	20,6	1466 ± 25,7	71,2	97

* Concentração da proteína determinada pelo Método de Bradford. **Atividade da enzima em 340 nm

No novo vetor de expressão (pET28A) usando o protocolo descrito neste trabalho, em 250 mL de cultura induzida foi obtido 20,6 mg de proteína, enquanto que no protocolo descrito na literatura usando o vetor pET3a é obtido 19,6 mg de proteína em 500 mL de cultura, um aumento de duas vezes o rendimento. [23]

O novo protocolo obtido para a produção da enzima TcGAPDH garante uma significativa quantidade de proteínas sendo expressa, com atividade comparável as enzimas já descritas na literatura. A vantagem deste método de expressão está na etapa de purificação: em apenas uma etapa, com uma resina de troca-iônica de coluna aberta, consegue-se separar a proteína de interesse dos demais constituintes do meio de expressão, um processo fácil e de baixo custo.

A determinação da cinética da reação catalisada pela enzima His₆-TcGAPDH, garante-se a cinética de pseudo primeira ordem com relação ao NAD⁺ (Figura 7.12a) e L-G3P (Figura 7.12b).

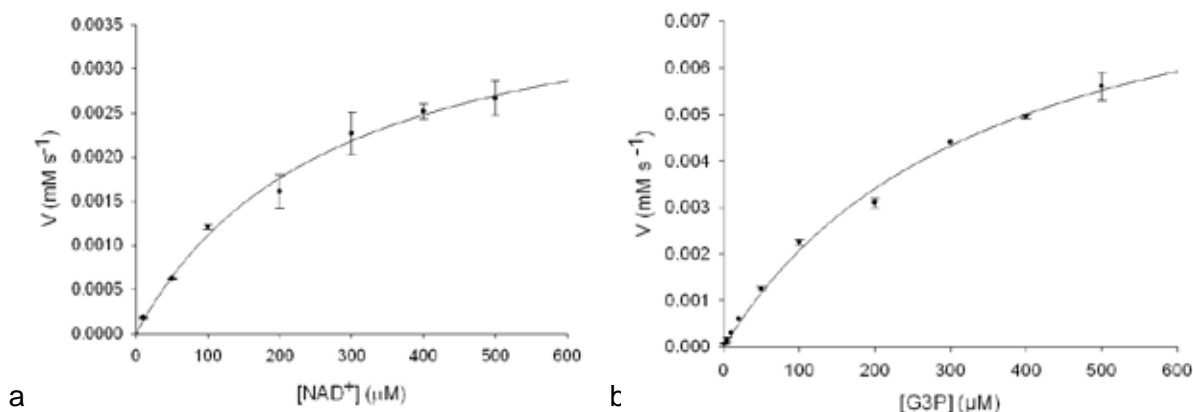


Figura 7.12. Curva cinética para a His₆-TcGAPDH. a) Substrato NAD⁺: $K_M = 272 \pm 25 \mu\text{M}$ e $V_{max} 3,2 \pm 0,4 \mu\text{M s}^{-1}$. (b) Substrato G3P: $K_M = 352 \pm 21 \mu\text{M}$ e $V_{max} = 6,4 \pm 0,3 \mu\text{M s}^{-1}$. Figura adaptada. ^[24]

Os substratos NAD⁺ e G3P tiveram as constantes de Michaelis calculadas por ajuste não linear na equação de Michaelis-Menten. É possível notar que o K_M do NAD⁺ é um pouco menor que o do G3P, indicando que a enzima possui uma afinidade ligeiramente maior pelo NAD⁺. Além de exibir uma maior afinidade pela enzima, Copeland *et al.* mostraram que a incubação da GAPDH com o G3P não evita que a enzima perca rapidamente a sua atividade.^[25] Já quando a incubação é feita com NAD⁺ não foi observada redução na atividade da enzima por um período de 2 horas.^[25] Esse resultado indica que o NAD⁺ é importante para manter a enzima na conformação ativa. Segundo a Tabela 7.5 pode-se observar que os parâmetros cinéticos permanecem na mesma ordem de grandeza para a enzima sem his-tag.

Tabela 7.5. Comparação dos valores de K_M das GAPDHs determinadas por UV-Vis

$K_M^{\text{NAD}^+}$ (μM) *	K_M^{G3P} (μM) *	Descrição
272 ± 25	352 ± 21	His ₆ -TcGAPDH
258 ± 150	425 ± 17	TcGAPDH ^[26]
1,05	0,83	Razão His ₆ -TcGAPDH / TcGAPDH

* Médias de três medidas independentes.

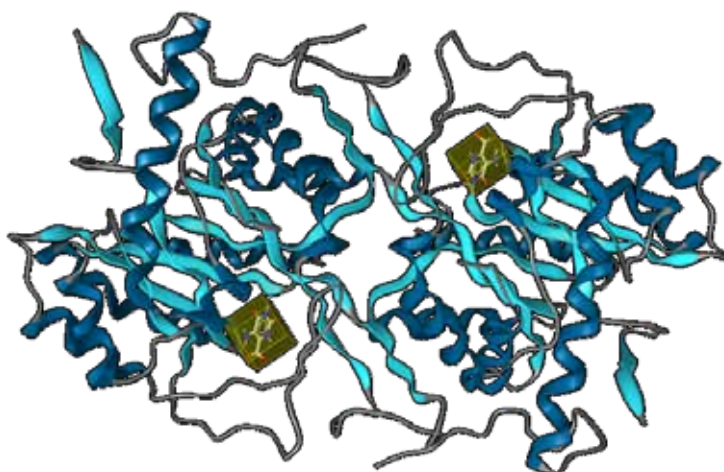
7.6. Referência

- [1] COPELAND, R. A., *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*, New York: Wiley-VCH, 2000. 397 p.
- [2] VERLI, H.; BARREIRO, E. J. Um paradigma da química medicinal: a flexibilidade dos ligantes e receptores. **Quím. Nova**, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.
- [3] KOSHLAND, D. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. **Proc. Nat. Acad. Scient. U. S. A.**, v. 44, p. 98-104, 1958.
- [4] GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. Enzyme kinetics. In: *BIOCHEMISTRY*, London: Hardcover, 1999. p. 426-459.
- [5] ABABOU, A.; LADBURY, J. E. Survey of the year 2004: literature on applications of isothermal titration calorimetry. **J. Mol. Recog.**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 2006.
- [6] TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity? **Anal. Biochem.**, v. 296, n. 2, p. 179-187, 2001.
- [7] LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chem. & Biol.**, v. 3, n. 10, p. 791-801, 1996.
- [8] CHELESKI, J.; WIGGERS, H. J.; CITADINI, A. P.; DA COSTA FILHO, A. J.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry. **Anal. Biochem.**, v. 399, n. 1, p. 13-22, 2010.
- [9] OLSEN, S. N. Applications of isothermal titration calorimetry to measure enzyme kinetics and activity in complex solutions. **Therm. Acta**, v. 448, n. 1, p. 12-18, 2006.
- [10] EDWARDS, P. M. Origin 7.0: Scientific Graphing and Data Analysis Software. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, v. 42, p. 1270-1271, 2002.
- [11] SYSTAT SOFTWARE. Sigmaplot 10. [Programa de Computador]. Richmond: [s.n], 2006, 1 CD-ROM.
- [12] FUKADA, H.; TAKAHASHI, K. Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride. **Prot. Struct. Funct., Bioinfo.** v. 33, n. 2, p. 159-166, 1998.
- [13] FELICIANO, P. R.; CORDEIRO, A. T.; COSTA-FILHO, A. J.; NONATO, M. C. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Prot. Expres. Purif.**, v. 48, n. 1, p. 98-103, 2006.
- [14] ARAKAKI, T. L. et al. Characterization of *Trypanosoma brucei* dihydroorotate dehydrogenase as a possible drug target; structural, kinetic and RNAi studies. **Mol. Microbiol.**, v. 68, n. 1, p. 37-50, 2008.
- [15] NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; ROWLAND, P.; LARSEN, S. Purification and characterization of dihydroorotate dehydrogenase a from *Lactococcus lactis*, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the enzyme. **Prot. Sci.**, v. 5, n. 5, p. 852-856, 1996.
- [16] ZAMEITAT, E.; PIERIK, A. J.; ZOCHER, K.; LÖFFLER, M. Dihydroorotate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*: spectroscopic investigations with the recombinant enzyme throw light on catalytic properties and metabolism of fumarate analogues. **FEMS Yeast Res.**, v. 7, n. 6, p. 897-904, 2007.

- [17] LIPINSKI, C. Solubility in the design of combinatorial libraries. In: YAN, B. (Ed.). Chemical analysis: analysis and purification methods in combinatorial chemistry. New York: Wiley Interscience, 2004. v. 163, p. 407-434.
- [18] LENEVICH, S.; XU, J.; HOSOKAWA, A.; CRAMER, C. J.; DISTEFANO, M. D. Transition State Analysis of Model and Enzymatic Prenylation Reactions. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, n. 18, p. 5796-5797, 2007.
- [19] ANDÚJAR-SÁNCHEZ, M.; LAS HERAS-VÁZQUEZ, F. J.; CLEMENTE-JIMÉNEZ, J. M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, S.; CAMARA-ARTIGAS, A.; RODRÍGUEZ-VICO, F.; JARA-PÉREZ, V. Enzymatic activity assay of d-hydantoinase by isothermal titration calorimetry. Determination of the thermodynamic activation parameters for the hydrolysis of several substrates. **J. Biochem. Biophys. Methods**, v. 67, n. 1, p. 57-66, 2006.
- [20] SCHRAMM, V. L. Enzymatic transition states and transition state analogues. **Cur. Opin. Struct. Biol.**, v. 15, n. 6, p. 604-613, 2005.
- [21] EFTINK M. R.; BILTONEN, R. L.; Energetics of ribonuclease A catalysis, 3, Temperature dependence of the hydrolysis of cytidine cyclic 2',3'-phosphate, **Biochem.**, v. 22, 5140-5150, 1983.
- [22] MA, B.; KUMAR, S.; TSAI, C.-J.; HU, Z.; NUSSINOV, R. Transition-state Ensemble in Enzyme Catalysis: Possibility, Reality, or Necessity? **J. Theor. Biol.**, v. 203, n. 4, p. 383-397, 2000.
- [23] HANNAERT, V.; OPPERDOES, F.R.; MICHELS, P.A.; Glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: Expression in *Escherichia coli*, purification, and characterization of the enzymes. **Prot. Expr. Purif.**, v. 6, n. 3, p. 244-250, .
- [24] CHELESKI, J.; FREITAS, R. F.; WIGGERS, H. J.; ROCHA, J. R.; DE ARAÚJO, A. P. U.; MONTANARI, C. A. Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Prot. Expr. Purif.**, v. 76, n. 2, p. 190-196, 2011.
- [25] COPELAND, L.; ZAMMIT, A. Kinetic properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the host fraction of soybean root nodules. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 312, p. 107-113, 1994.
- [26] CARDOSO, C. L.; MORAES, M. C.; GUIDO, R.V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D.; WAINER, I. W.; CASS, Q. B.; The development of an immobilized enzyme reactor containing glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: The effect of species' specific differences on the immobilization. **Anal.**, v. 133, p. 93-99, 2008.

Capítulo 8

Inibidores das DHODHs: Cinética e Estrutura Cristalográfica



Neste capítulo, será feita uma breve descrição sobre os inibidores enzimáticos reversíveis. Em seguida, serão apresentados os resultados de inibição enzimática das substâncias selecionadas pelos métodos de *virtual screening*, assim como a estrutura cristalográfica dos co-complexos.

8. INIBIDORES DAS DHODHS: CINÉTICA E ESTRUTURA CRISTALOGRÁFICA

8.1. Inibição enzimática

Muitas substâncias inibem as enzimas e interagem de diferentes formas com o alvo biomacromolecular. A forma de interação entre alvo e ligante que envolve interações não covalentes e apresentam velocidades de associação/dissociação muito rápidas são classificadas como inibição reversível, seja esta competitiva, não competitiva e incompetitiva.

Na inibição irreversível há a formação de ligações químicas entre o alvo e o ligante (ligações covalentes) e inativação do alvo biológico. Isto ocorre tipicamente através da formação de uma ligação covalente entre algum grupo do inibidor e um resíduo de aminoácido na enzima. ^[1] Alguns inibidores interagem tão fortemente numa enzima que eles são considerados por todas as razões práticas como permanentemente ligados (isto é, as suas velocidades de dissociação são muito lentas). Estes inibidores formam uma classe especial conhecida como inibidores que interagem fortemente (“*tight binding*”). Contudo, os inibidores reversíveis ^[1,2] são os mais comuns e serão descritos a seguir.

8.2. Inibidores reversíveis

8.2.1. Inibição Competitiva

Na inibição competitiva os dois ligantes, tanto o inibidor quanto o substrato, competem pela mesma forma da enzima e geralmente interagem em sítios mutuamente exclusivos; isto é, a enzima livre ^[1,2] interage ou com o substrato ou com o inibidor, mas nunca com ambos (Figura 8.1a). Nesse tipo de inibição, o inibidor usualmente apresenta alguma similaridade estrutural com o substrato ou com o estado de transição da reação.

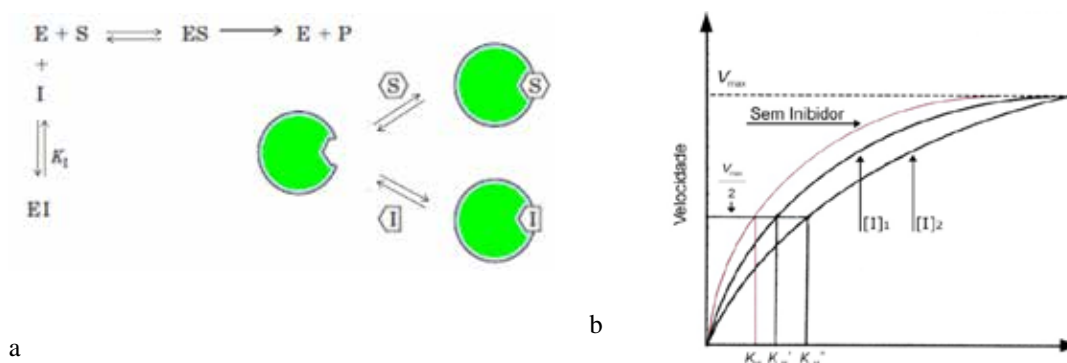


Figura 8.1. (a) Representação esquemática da inibição competitiva; (b) Gráfico da variação da velocidade de reação na presença de um inibidor competitivo. Figura adaptada. ^[1]

Os inibidores competitivos aumentam o valor do K_M por um fator igual a $(1 + [I]/K_i)$, sem alterar a V_{max} , Equação 1. Quanto maior a afinidade do inibidor pela enzima (medida de K_i), maior será o seu efeito aparente no valor de K_M . Concentrações crescentes de inibidor também afetam a velocidade de reação, com reflexos diretos no respectivo valor de K_M (Figura 7.1). Por outro lado, o efeito aparente de um inibidor competitivo na reação catalisada pode ser revertido à medida que a concentração de substrato é aumentada, pois há o deslocando da molécula de inibidor com a consequente diminuição da espécie enzima/ inibidor [EI].

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (1)$$

8.2.2. Inibição Não-competitiva

Os inibidores do tipo não-competitivo não se ligam ao sítio ativo da enzima (região de interação do substrato) e, portanto, não tem efeito na interação deste. Os inibidores não-competitivos apresentam afinidade de interação pela enzima livre (em sítios de ligação distintos do sítio do substrato) e pelo complexo binário enzima/substrato [ES], Figura 8.2. Assim, o efeito de um inibidor não-competitivo é o

de diminuir o valor de V_{max} sem afetar o valor de K_M . Isto é refletido na equação de velocidade para um inibidor não-competitivo.

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i}\right) + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (2)$$

No gráfico duplo-recíproco (Figura 8.2b), o efeito provocado pelo inibidor não-competitivo mostra que tanto a interseção com o eixo Y quanto a inclinação das retas (K_M/V_{max}) varia de acordo com a $[I]$. Todas as retas interceptam o eixo X (correspondente à $-1/K_M$) no mesmo ponto independente da $[I]$.^[1-2]

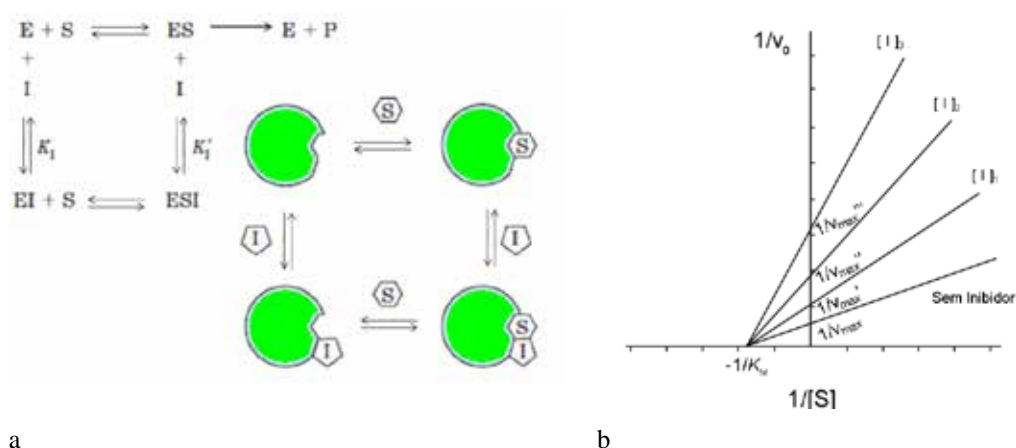


Figura 8.2. (a) Representação esquemática da inibição não-competitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor não-competitivo. Figura adaptada.^[1]

8.2.3. Inibição Incompetitiva

Os inibidores do tipo incompetitivo se ligam exclusivamente ao complexo enzima/substrato $[ES]$ e não possuem afinidade pela enzima livre. O complexo resultante, enzima/substrato/inibidor $[ESI]$ é cataliticamente inativo.^[2] O efeito aparente de um inibidor incompetitivo é o decréscimo de V_{max} e K_M . Embora existam exemplos de fármacos de sucesso que atuam por esse mecanismo (e.g., metotrexato, finasterida,

camptotecina), essa não é uma modalidade comum. A representação esquemática das interações entre um inibidor incompetitivo, substrato e enzima é mostrada na Figura 8.3.

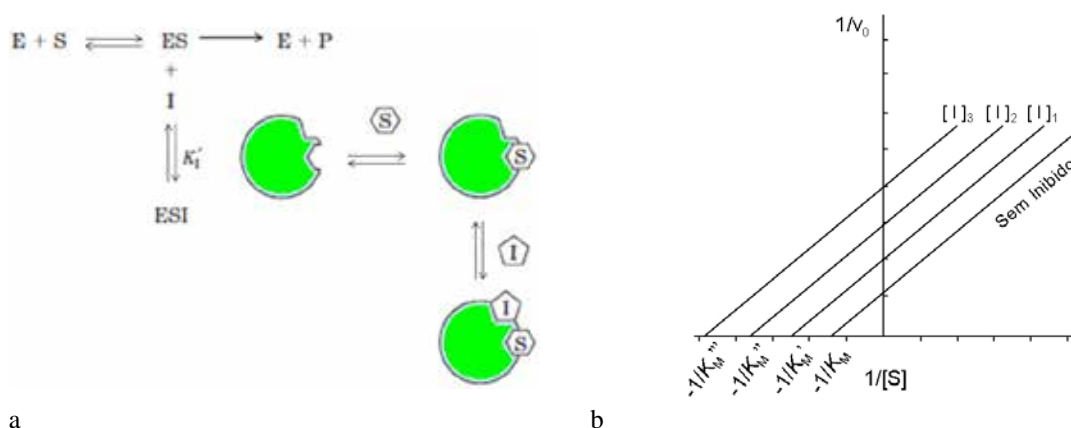


Figura 8.3. (a) Representação esquemática da inibição incompetitiva; (b) Gráfico Lineweaver-Burk (duplo-recíproco) evidenciando o efeito de um inibidor incompetitivo. Figura adaptada. [1]

A equação de velocidade para esse tipo de inibição é

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] \left(1 + \frac{[I]}{\alpha K_i} \right) + K_M} \quad (3)$$

Num gráfico de Lineweaver-Burk a diminuição do valor aparente de V_{max} é refletida através de diferentes intercessões no eixo Y para concentrações crescentes do inibidor incompetitivo. A inclinação das retas proporciona a determinação de K_M/V_{max} , que são afetados igualmente na presença de um inibidor incompetitivo. [1-2] Assim, o termo $(1+[I]/\alpha K_i)$ é cancelado na razão K_M/V_{max} , o que indica que a inclinação das retas é constante para todas as concentrações do inibidor (Figura 8.3b). Assim como no caso do eixo Y, também a intercessão com o eixo X varia com a concentração do inibidor, fornecendo diferentes valores para o termo $-1/K_M$, evidenciando-se que também o valor de K_M aparente diminui na inibição incompetitiva (Figura 8.3b).

8.3. Materiais

O ácido diidroorótico (DHO), ácido orótico (ORO), ácido fumárico (FUM), base Trizma foram obtidos da *Sigma–Aldrich* (St. Louis, MO). O cloreto de sódio foi adquirido da *Fluka*.

Foram adquiridas 26 substâncias de seis empresas (*Interbioscreen, Sigma, Enamine, Asinex, Life Chemicals, TimTec LLC e Chembridge*), sendo que estas foram avaliadas como possíveis inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) de *Trypanosoma cruzi*.

8.4. Procedimento Experimental

8.4.1. Estudos da inibição enzimática

Os ensaios de inibição foram realizados preenchendo-se a cela de reação com o tampão Tris 20 mM, 150 mM NaCl pH 8,0, FUM 1,6 mM, TcDHODH 50 nM em 5% v/v de DMSO. A seringa foi preenchida com a solução contendo DHO 1,0 mM no mesmo tampão da cela de reação. Titulou-se a solução de DHO na solução contendo a enzima através de 12 injeções consecutivas de 1,0 mL, com o intervalo entre as injeções de 60 segundos. Um experimento controle (na ausência do inibidor) foi realizado antes de cada ensaio de inibição seguindo o mesmo protocolo. As substâncias foram adicionadas à cela de amostra numa concentração final variando de 0,1 até 100 mM. O mesmo procedimento experimental foi realizado na presença da enzima LmDHODH ao invés da TcDHODH para o teste de duas substâncias que tiveram a estrutura cristalográfica resolvida, como descrito na seção 8.6.2.1.

Todos os dados foram analisados usando o programa SigmaPlot 10.0.1^[3] e as constantes de inibição aparente (K_i^{app}) foram determinadas através da regressão não-

linear dos mínimos quadrados à equação de Michaelis-Menten na ausência e na presença do inibidor.

8.5. Resultados e Discussão

8.5.1. Estudos da inibição enzimática

Previamente aos testes das substâncias, estas tiveram a solubilidade teórica verificada usando o programa *SciFinder*^[4]. Apesar de algumas substâncias serem teoricamente solúveis, a maioria apresentava uma baixa solubilidade em água e então optou-se por preparar soluções estoque dessas substâncias (4 mM) em DMSO puro.

Um experimento controle (na ausência do inibidor) foi realizado previamente aos testes das substâncias, pois assim é possível avaliar se as alterações na velocidade e no K_M sejam atribuídas apenas ao efeito do inibidor não a perda de atividade da enzima. Foram realizados experimentos pelo menos em duplicata (tanto para o controle como na presença do inibidor).

Os dados obtidos nos ensaios de inibição foram analisados usando o programa *SigmaPlot* e ajustados às equações referentes aos mecanismos de inibição competitiva, não-competitiva e incompetitiva. A decisão sobre qual mecanismo é mais apropriado para cada substância foi feita com base na análise dos parâmetros estatísticos dos modelos e na forma das curvas obtidas experimentalmente.


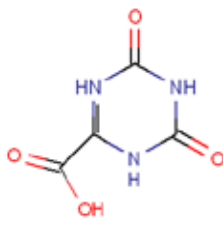
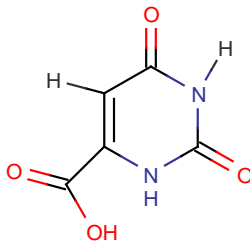
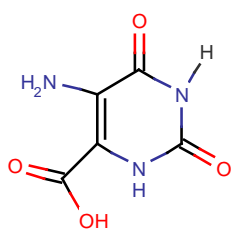
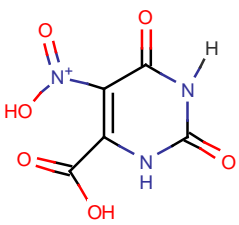
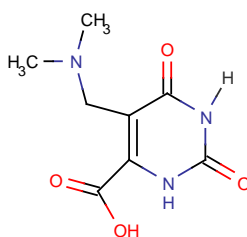
8.5.2. Substâncias ativas

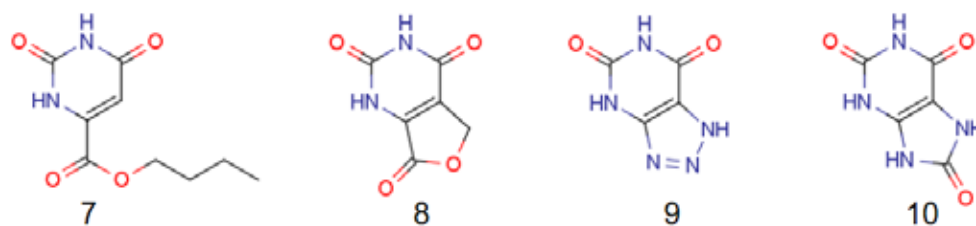
8.5.2.1. Primeira geração de substâncias ativas

A identificação de novos sítios como regiões atrativas de serem exploradas individualmente ou em combinação abre uma ampla possibilidade para a busca de inibidores da enzima TcDHODH, como descritos amplamente no Capítulo 5. Estes estudos foram focados na busca de ligantes para os sítios S1-S2.

O produto de reação, orotato, um inibidor da enzima TcDHODH (seção 7.4.3), é um excelente ponto de partida (como esqueleto molecular) para a busca de inibidores, pois forma uma rede de interações complementares e específicas dentro do sítio ativo da proteína (S1). A Tabela 8.1 mostra as estruturas moleculares das dez substâncias que foram primeiramente adquiridas comercialmente e testadas contra a enzima TcDHODH, assim como os valores de K_i^{app} e o mecanismo de inibição. O conceito chamado de *eficiência do ligante* (LE), mostrado na Tabela 8.1, amplamente utilizado na comparação de moléculas em uma série, será discutido sem seguida, na seção 8.5.2.2.

Tabela 8.1. Substâncias da primeira geração testadas contra a TcDHODH

Substância	K_i^{app} (μM)	95% Intervalo Conf.	NHA ^a	LE ^b	Mecanismo ^c
1 	19,28 ± 4,01	11,19 a 27,37	12	0,54	Competitivo
2 	21,70 ± 4,36	12,94 a 30,45	11	0,58	Competitivo
3 	72,21 ± 7,41	57,24 a 87,18	11	0,51	Competitivo
4 	94,79 ± 14,98	64,96 a 124,63	12	0,46	Competitivo
5 	139,24 ± 26,04	87,34 a 191,14	14	0,38	Competitivo
6 	300 ± 20,08	270,20 a 335,12	15	0,32	Competitivo



^aNHA: átomos diferente de hidrogênio; ^bLE: eficiência do ligante em kcal mol⁻¹ atom⁻¹; ^cMelhor ajuste no modelo competitivo. Substâncias **7-10**: inativas, testadas na concentração máxima de 100 μM. Parâmetros estatísticos: Graus de liberdade 50; Soma dos quadrados 4,35 x 10⁻¹⁰; Sy.x 2.02x10⁻¹²; Valores do Teste p < 0.001 e AICc -658.79.

A Figura 8.4 mostra as curvas de Michaelis-Menten para as quatro substâncias mais potentes listadas na Tabela 8.1.

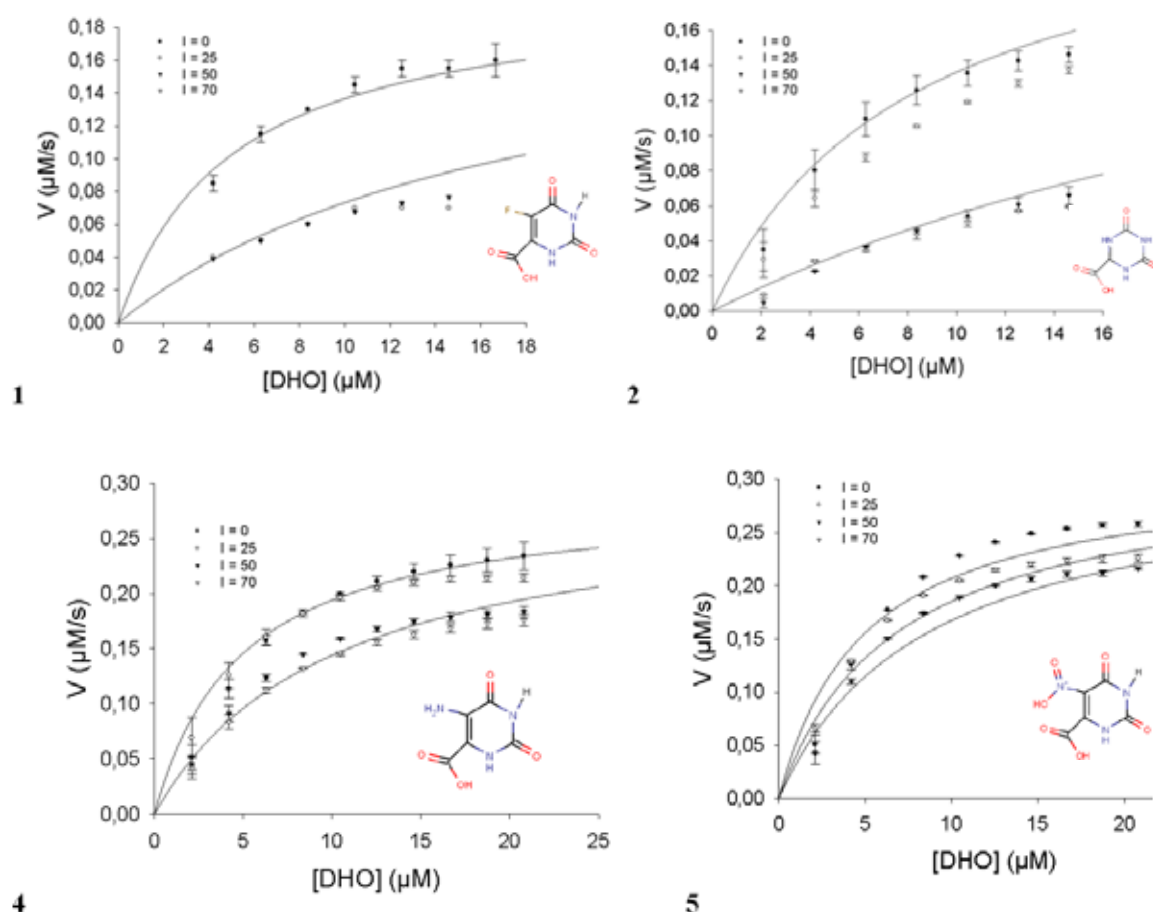


Figura 8.4. Curvas de Michaelis-Menten dos ensaios de inibição. As curvas controle de cada experimento são apresentadas junto com as curvas de inibição. A concentração dos inibidores variou de 25 μM a 70 μM. Todos os inibidores foram adicionados à cela de amostra junto à enzima.

Das dez substâncias testadas, seis inibem competitivamente a enzima TcDHODH em relação ao DHO, sendo molécula **1** a mais potente. Inibidores reversíveis competitivos interagem com a enzima através de forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, ao contrário dos inibidores irreversíveis, que interagem com a enzima através da formação de ligações covalentes. Inibidores dessa modalidade interagem exclusivamente na enzima livre e competem com o substrato pelo mesmo sítio ativo.

Assim, a enzima livre interage ou com o substrato ou com o inibidor. O efeito disso, é que a concentração necessária de substrato aumenta para que a reação alcance metade da velocidade máxima. Ou seja, o inibidor competitivo provoca um aumento no valor de K_M . Os resultados obtidos estão de acordo com a afirmação acima, já que para todas as substâncias listadas na Tabela 8.1, o valor de K_M aumentou na presença deles, confirmando o mecanismo de inibição competitiva.

Em termos dos valores de K_i^{app} , cinco substâncias podem ser consideradas como inibidores moderadamente potentes (baixo micro molar) da TcDHODH, em que a constante de inibição varia de 19,28 μM a 139,24 μM , Figura 8.5.

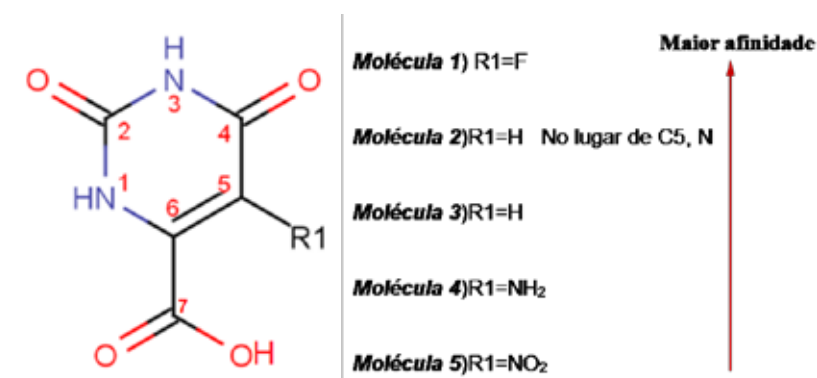


Figura 8.5. As cinco substâncias inibidoras da enzima TcDHODH. As melhores posições para as substituições moleculares são na posição C5, para alcançar S2.

As substâncias foram selecionadas de maneira a verificar a influência dos vários substituintes quando interagindo em S1 e S2 simultaneamente. A substância mais potente (molécula **1**, com K_i^{app} 19,28 μ M) é um bioisómero do produto de reação (molécula **3**), o hidrogênio é substituído pelo flúor, capaz de promover um efeito indutivo bem maior, favorecendo a interação no sítio ativo, enquanto as moléculas **4** e **5** são doadores/aceitadores de ligações de hidrogênio.

A molécula **7** foi selecionada para testar a capacidade do sítio de interagir com substituinte hidrofóbico. Porém, os resultados demonstram que a melhor posição para substituintes é a C5. Como previsto na docagem, as moléculas requerem uma mudança conformacional dentro do sítio para serem acomodadas entre as regiões S1 e S2. As carboxilas das moléculas **2** e **3** quando complexadas com a enzima TcDHODH (código PDB 2e6f) estão distorcidas na ligação entre o C6 e C7, com os átomos de oxigênio fora do plano.

As moléculas **7-10** têm baixa afinidade pela enzima, nas condições de ensaio deste trabalho, sendo consideradas inativas. Mesmo assim, foi calculado o valor aproximado da constante de afinidade $K_i^{app} \sim 1$ mM.

Substituintes na carboxila do anel pirimidinodiona não são favoráveis para a interação, como podemos observar a inatividade da molécula **7**, assim como a rigidificação de C6-C7 no anel pirimidinodiona (inativas as moléculas **8**, **9** e **10**). Podemos verificar a importância das ligações de hidrogênio do grupo carboxila com os átomos de hidrogênio da Asn132 da cadeia principal e demais aminoácidos no sítio S1, além do mais, podemos dizer que a proteína não é capaz de reconhecer substâncias que sofram modificações nesta região da molécula.

A enzima LmDHODH e TcDHODH têm 100 % de identidade sequencial nos aminoácidos dentro do sítio ativo (S1) e praticamente os mesmos resíduos de

aminoácidos em S2, como mostrado na alinhamento da Figura 8.6. As substâncias ativas foram enviadas para determinação da estrutura cristalográfica de Raios-X do complexo LmDHODH/inibidores, uma vez que o protocolo de cristalização da proteína LmDHODH é bem estabelecido no laboratório dos nossos colaboradores, sob coordenação da professora Dr. Maria C. Nonato do Laboratório de Cristalografia de Proteínas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), com a participação do doutorando Mateus P. Pinheiro.

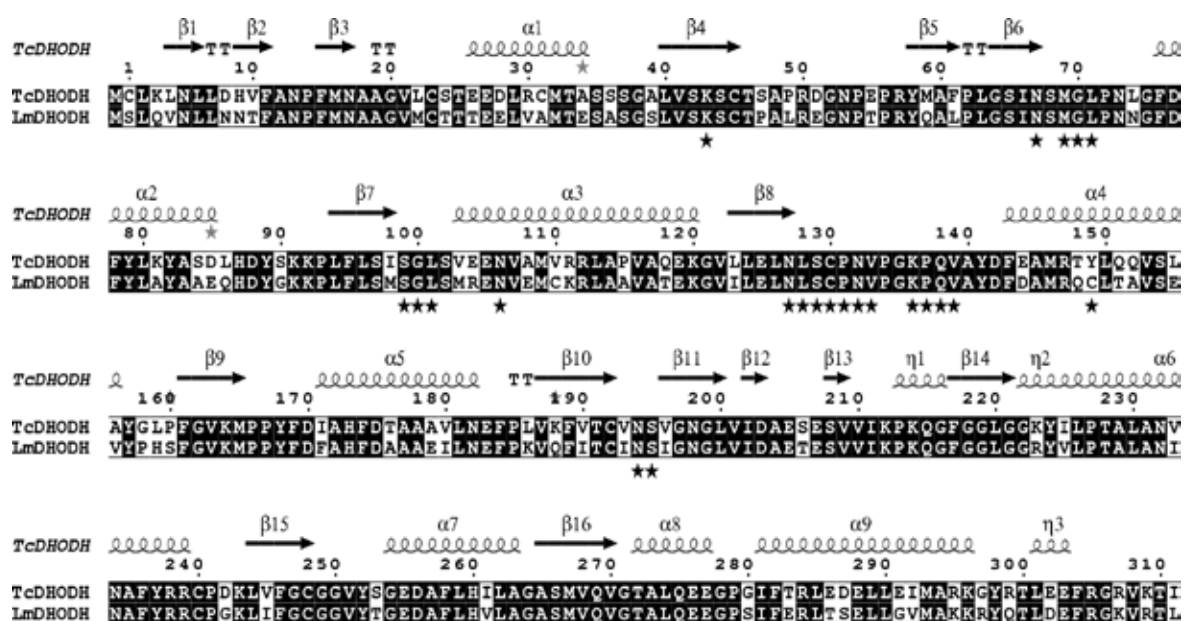


Figura 8.6. Alinhamento da TcDHODH e LmDHODH. Aminoácidos que pertencem ao sítio S1 e S2 estão marcados com estrelas. Em preto os aminoácidos idênticos nas proteínas. Alinhamento gerado com *Multialign*^[5]. As setas e as helicóides representam os aminoácidos que formam a estrutura secundária (folhas beta e alfa hélices, respectivamente).

As substâncias que tiveram as estruturas cristalográficas resolvidas com sucesso foram: molécula **4** (código PDB: 3MJY) e molécula **5** (código PDB: 3MHU). Na Tabela 8.2 são mostrados os parâmetros obtidos para os modelos dos complexos entre a enzima LmDHODH e essas duas substâncias. Com base nesses dados, pode-se dizer que ambos os modelos possuem bons conjuntos de parâmetros cristalográficos e podem ser considerados confiáveis para análises e obtenção de informações sobre o modo de interação dos ligantes com a proteína.

Tabela 8.2. Parâmetros cristalográficos obtidos para as estruturas dos complexos das substâncias 4 e 5 com a enzima LmDHODH

Complexo	Resolução (Å)	R _{factor}	R _{free}	(R _{free} - R _{factor})	Código PDB
Molécula 4 /LmDHODH	2,10	0,18	0,23	0,05	3MJY
Molécula 5 /LmDHODH	1,96	0,16	0,20	0,04	3MHU

A Figura 8.7 representa as interações das substâncias complexadas com a enzima LmDHODH.

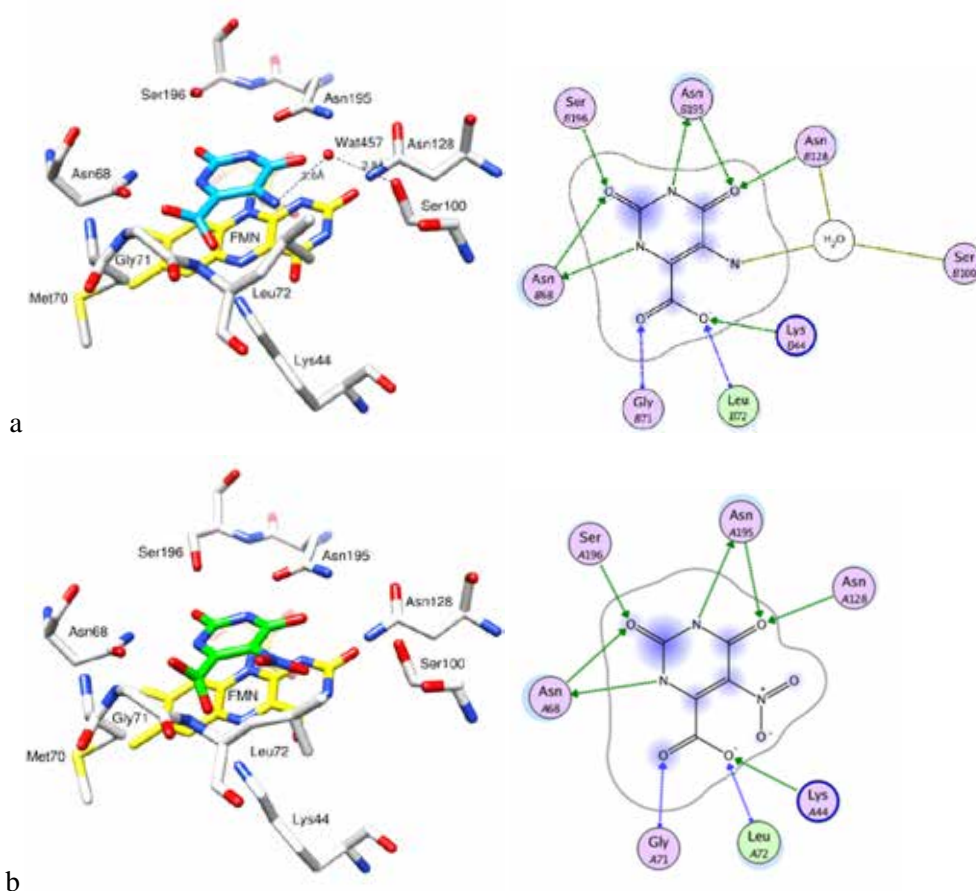


Figura 8.7. Mapa de interação 3D e 2D das substâncias (a) **4** e (b) **5** com os sítios S1/S2 da LmDHODH. Figura gerada com programa *USCF Chimera* [6]. Figura adaptada. [7]

Podemos observar que a substância **4** interage com o resíduo Ser100 (que corresponde ao resíduo Ser99 na TcdHODH) através de uma ligação de hidrogênio coordenada por uma molécula de água, já a substância **5** não é capaz interagir do mesmo modo. Isto pode ser a causa da maior potência da substância **4** (K_i^{app} 94,79 ± 14,98) em relação a substância **5** (K_i^{app} 139,24 ± 26,04). As análises estruturais dos complexos

indicam a possibilidade de que a enzima é capaz de acomodar substituintes mais volumosos na região S2. Além disso, podemos inferir que a razão para que a substância **4** seja mais potente que a substância **5**, não é devido à diferença entre os volumes dos substituintes, mas sim a diferença entre as interações destes no sítio.

A interação do inibidor com o resíduo Ser100, mesmo sendo coordenada através de uma molécula de água, traz informações relevantes para o planejamento de uma nova série de moléculas, pois este resíduo está localizado numa região mais externa ao sítio S1 em direção a S2 e, deste modo, moléculas com substituintes mais longos no C5 têm a possibilidade de interagir com os resíduos de aminoácidos em S2.

As substâncias **4** e **5** foram testadas contra a enzima LmDHODH utilizando o protocolo descrito na seção 8.5.1, pelo método de ITC. Os resultados estão descritos na Tabela 8.3.

Tabela 8.3. Comparação dos valores de K_i^{app} da LmDHODH e TcDHODH.

	Substância	K_i^{app} (μM) ^a	95% Intervalo Conf.	LE ($\text{kcal mol}^{-1} \text{atom}^{-1}$)
LmDHODH	4	$82,80 \pm 5,72$	71,24 a 94,32	0,46
TcDHODH	4	$94,79 \pm 14,98$	64,96 a 124,63	0,48
TcDHODH	5	$139,24 \pm 26,04$	87,34 a 191,14	0,38
LmDHODH	5	$212,93 \pm 11,53$	189,69 a 236,16	0,36

^a Melhor ajuste no modelo competitivo.

As substâncias **4** e **5** competem pelo mesmo sítio ativo nas enzimas de *T. cruzi* e *L. major* com relação ao substrato DHO, com o mesmo mecanismo de inibição enzimática e mesma constante de afinidade aparente. Assim, podemos inferir que os inibidores encontrados para a enzima TcDHODH podem ser estendidos a outras enzimas da Classe 1A, assim como para a LmDHODH, como demonstrado pelos estudos de inibição enzimática por ITC e pelas estruturas cristalográficas.

Assim, com os resultados dos ensaios de ITC e as estruturas cristalográficas, podemos listar as características para guiar a busca de novos inibidores da enzima TcDHODH, focando em S1 e S2:

- Substituintes no C5 da molécula de orotato ou substâncias análogas são mais apropriadas do que em C6 ou no oxigênio carboxílico;
- Rigidificação do grupo carboxílico com a presença de um anel de cinco membros envolvendo C5 e C6 resulta na perda do reconhecimento molecular;
- Seria favorável para a interação a presença de conexões não polares em C5, pois os resíduos das fronteiras S1 e S2 são hidrofóbicos.

Para a busca de novas moléculas inibidoras da enzima TcDHODH, foi realizada a busca nos bancos de dados de moléculas comercialmente disponíveis. Foram selecionadas cerca de 100 moléculas contendo substituintes com cadeias mais longas que as substâncias testadas previamente e, que em tese, pudessem se estender ao longo da região S2. Estas moléculas foram docadas (conforme descrito na seção 5) e após a inspeção visual, os que apresentaram melhor complementaridade com a região S2, foram selecionados para um novo ensaio contra a enzima TcDHODH. Estas substâncias foram chamadas de ‘segunda geração’.

8.5.2.2. Eficiência do ligante

Hopkins *et al.* propuseram uma métrica para normalizar a potência pela massa molecular. Esta métrica está relacionada ao conceito de Eficiência do Ligante (LE, do inglês, *Ligand Efficiency*) de uma substância.^[8]

Com base apenas no exame do valor de K_i^{app} poderia se chegar à conclusão de que a substância **1** seria considerado um razoável inibidor da TcDHODH. Contudo, é necessário avaliar a eficiência do ligante. Esse parâmetro pode ser usado para

determinar a qualidade dos ligantes obtidos no ensaio inicial e também para monitorar a qualidade dos compostos-matrizes que estão sendo otimizados. A eficiência do ligante é calculada da seguinte maneira:

$$LE = - \frac{DG}{HAC} \gg - RT \ln(K_i^{app}) / HAC \quad (4)$$

onde ΔG é a energia de interação do ligante por um alvo específico, HAC é o número de átomos diferentes de hidrogênio e o K_i^{app} como uma medida aproximada da afinidade do ligante pelo alvo. Para que um ligante ou composto-matriz seja útil ele deve apresentar uma LE aproximadamente igual a $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$. A Figura 8.8 ilustra o conceito de eficiência do ligante e como ele está relacionada com a “acessibilidade” química do ligante. [9] Para se tornar um candidato a composto-matriz, a potência de um ligante precisa ser melhorada, o que quase sempre ocorre em paralelo com um aumento da massa molecular. [10] Os ligantes oriundos da técnica de HTS apresentam uma extensa faixa de massas moleculares (250-600 Da) e geralmente exibem afinidades na faixa de baixo nM até alto nM. [10] Dificilmente a otimização, de um número significativo desses ligantes, irá produzir moléculas que se enquadrem no espaço químico definido pela *regra dos cinco* de Lipinski [11], a qual serve como um guia qualitativo para predizer se as moléculas apresentarão boa absorção e permeabilidade.

Contudo, como os ligantes com características de *fragmentos moleculares* [12,13] são menos complexos (menor massa molecular), são capazes de fazer interações mais específicas, podendo se ajustar com maior facilidade no sítio do alvo. Assim, na otimização dessas substâncias, não só a afinidade aumenta, mas também o perfil farmacocinético adequado é mantido [11]. As substâncias ativas contra a enzima

TcDHODH podem ser consideradas fragmentos moleculares, que são moléculas que cumprem as seguintes características: massa molecular ≤ 300 Da; número de doadores e receptores em ligações de hidrogênio ≤ 3 ; clogP ≤ 3 ; número de ligações livres ≤ 3 ; área superficial polar ≤ 60 Å.

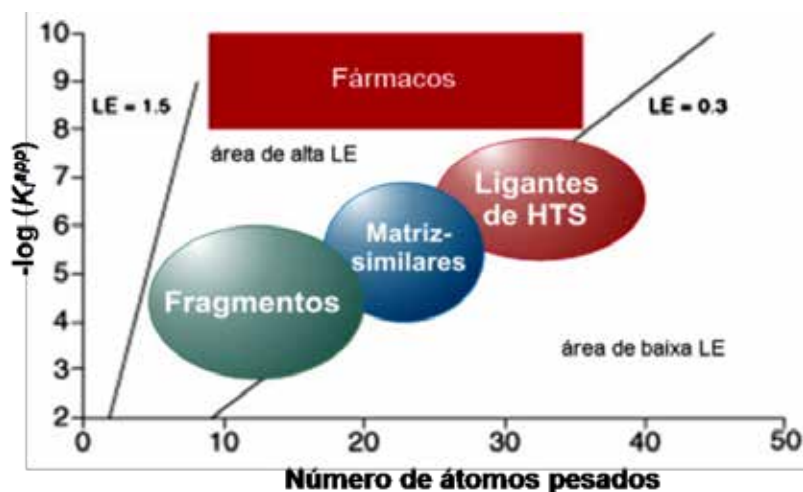


Figura 8.8. Evolução do ligante a composto-matriz partindo de diferentes espaços químicos. Figura adaptada. [9]

Vários trabalhos na literatura mostram que partindo-se de pequenas moléculas que apresentem uma eficiência do ligante próxima de $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$ é possível realizar a sua otimização, que geralmente é feita através da união de duas ou mais moléculas (*linking*) ou através do crescimento da molécula (*growing*). Na união de substâncias que apresentem uma eficiência do ligante em torno de $0,29 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$ é observado um efeito sinérgico extraordinário e a molécula resultante pode apresentar uma potência que, em alguns casos, pode chegar a ser superior a duas unidades logarítmicas com relação às estruturas de partida. [14]

Analisando as Tabelas 8.1 e 8.3 constata-se que os inibidores encontrados nesse trabalho apresentam uma massa molecular em torno de 200 Da e cerca de 12 átomos pesados. A eficiência do ligante dessas substâncias está por volta de $0,47 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ átomo}^{-1}$.

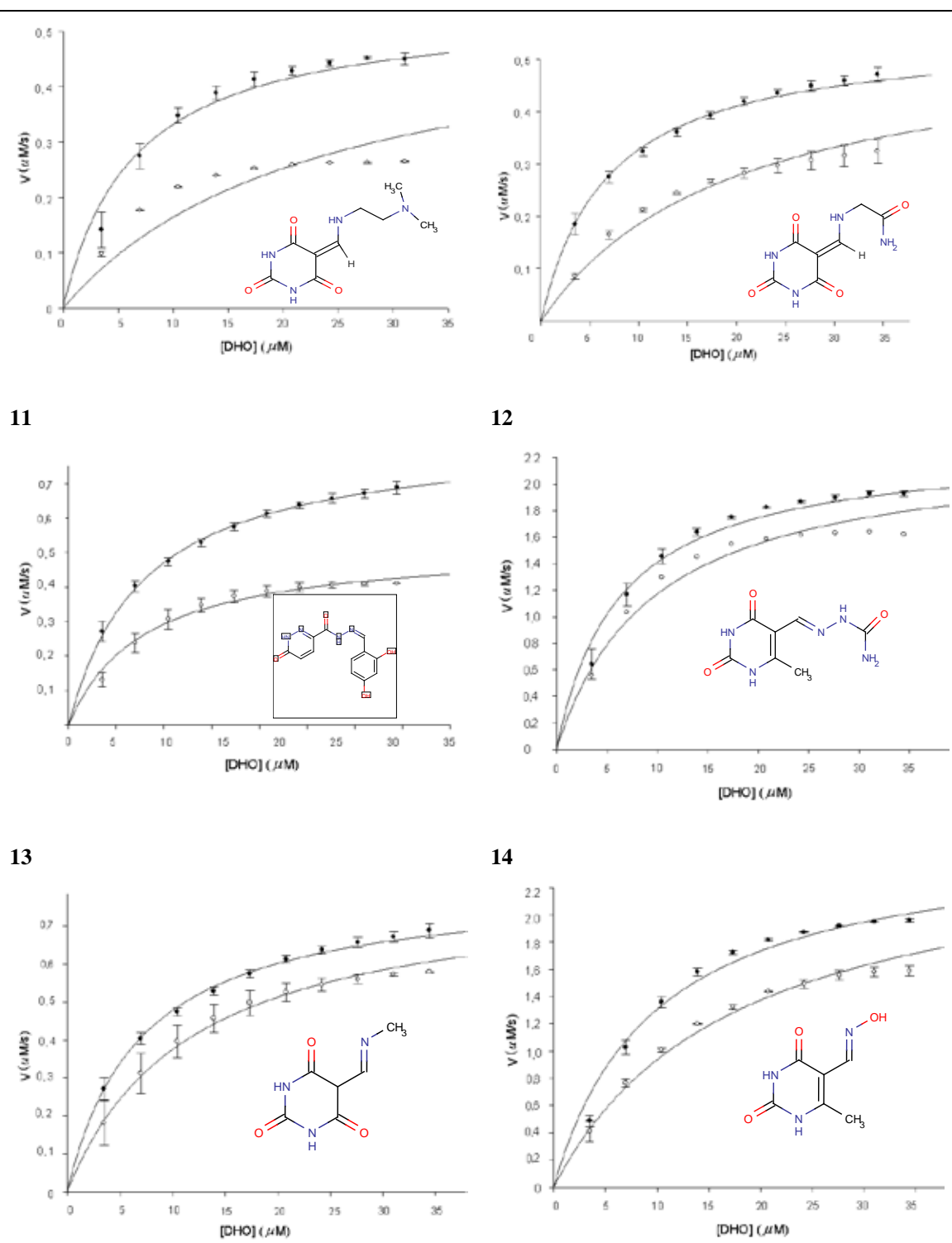
Com base nessa análise, podemos dizer que muitas dessas moléculas são atraentes do ponto de vista da otimização. Devido ao seu tamanho, estas permitem que haja uma adição de aproximadamente 300 Da na massa da molécula durante o processo, já que o limite do considerado ideal para um fármaco administrado de forma oral é de 500 Da.

8.5.2.3. Segunda geração de substâncias ativas

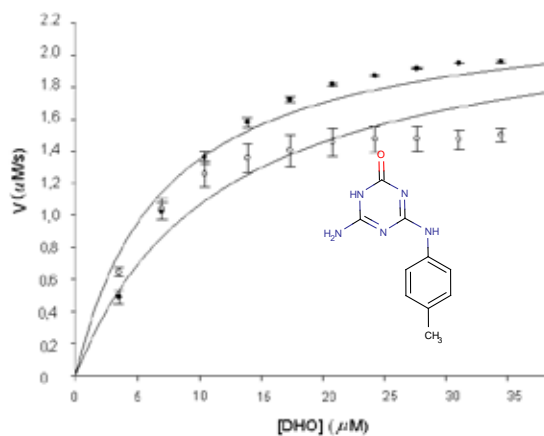
Considerando-se as informações sobre as relações estrutura-atividade das substâncias avaliadas previamente, foi feita uma nova busca em bancos de dados por moléculas comercialmente disponíveis, que possuíssem substituintes com cadeias mais longas e que, em tese, pudessem se estender ao longo da cavidade S2. Com novas moléculas com uma ampla diversidade de substituintes no C5 do anel pirimidinona foram recuperadas e docadas levando em consideração a flexibilidade dos resíduos pertencentes à alça α 4- β A. A inserção de flexibilidade durante a docagem dos ligantes contendo substituintes mais volumosos no C5 do anel pirimidinona é uma tentativa de minimizar os contatos desfavoráveis dos substituintes com resíduos localizados na região entre os sítios S1 e S2, promovendo uma maior adaptabilidade da forma do sítio à diversidade de substituintes ocupando o sítio S2 durante o processo de docagem e pontuação.

Baseado nos resultados da docagem molecular com ajuste induzido, novas moléculas foram selecionadas visando à identificação de inibidores que pudessem interagir em regiões que se estendem além do sítio catalítico. Foram adquiridas 16 novas moléculas e testadas conforme descrito no procedimento 8.6.1. Previamente aos experimentos de inibição, foi realizado o experimento controle (na ausência do inibidor). Os dados obtidos nos ensaios de inibição foram adquiridos a partir de

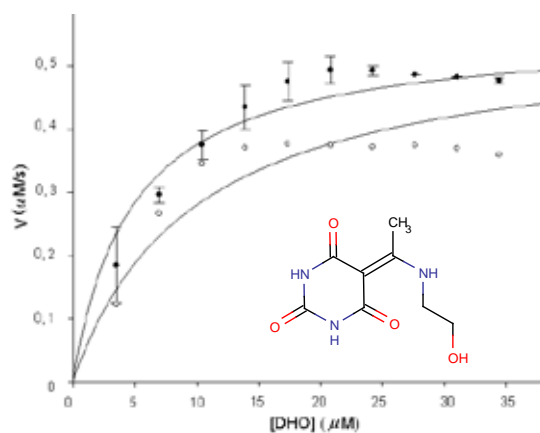
experimentos realizados pelo menos em duplicata (tanto para o controle como para o ensaio de inibição). Esses dados foram analisados empregando-se o programa *SigmaPlot* e ajustados às equações referentes aos mecanismos de inibição competitiva, não-competitiva e incompetitiva. Na Figura 8.9 são mostrados os resultados obtidos experimentalmente.



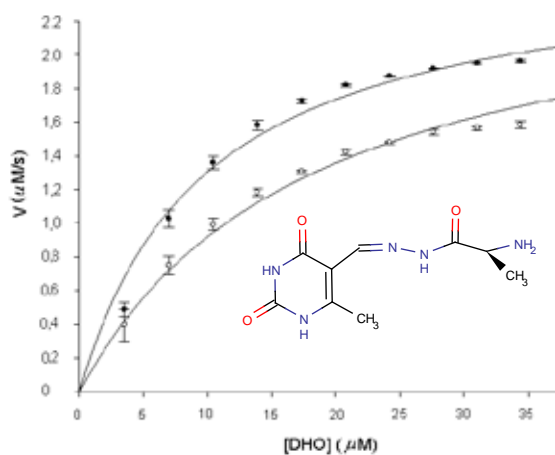
15



16



17



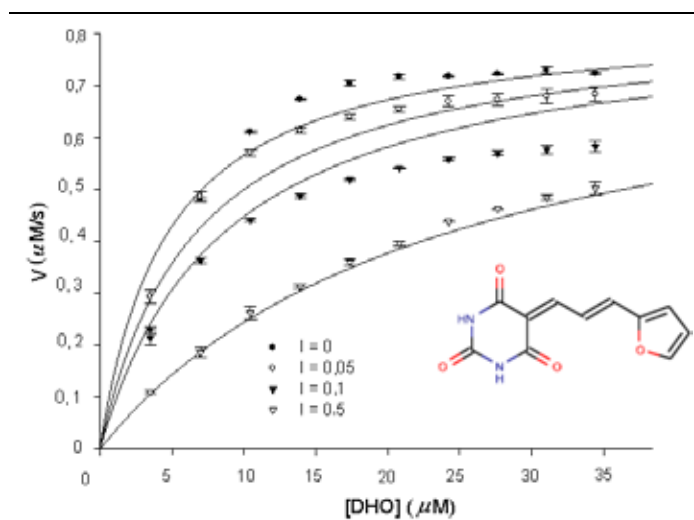
18

19

Figura 8.9. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para os inibidores que atuam pelo mecanismo de inibição competitivo contra a enzima TcDHODH. As estruturas químicas das substâncias também estão representadas. Curva em preto: experimento controle ($I = 0$); Curva em branco: concentração do inibidor é igual a 100,00 μM .

Nos ensaios calorimétricos, foi mantida a concentração fixa de inibidor em 100 μM . Porém, durante os experimentos, o inibidor **20** inativou completamente a enzima nesta concentração devido a sua alta afinidade pelo alvo; por esta razão, os experimentos cinéticos subsequentes foram realizados utilizando-se diluição em série desta substância para que pudesse ser obtida a curva cinética em menores concentrações

de inibidor, Fig. 8.10. As concentrações necessárias para que a molécula não inativasse completamente o alvo enzimático foram de 0,1, 0,5 e 0,05 μM .



20

Figura 8.10. Ajuste dos dados à curva de Michaelis-Menten para a molécula com maior afinidade contra a TcDHODH. A estrutura química da substância também está representada. $I = 0$: experimento controle; a concentração do inibidor variou de 0,1, 0,5 e 0,05 μM .

Das dezesseis substâncias testadas, duas não foram ativas contra a TcDHODH na concentração de 100 μM . A maioria dessas substâncias não alterou o curso normal da reação, ou seja, os valores de K_M e V_{max} permaneceram inalterados na presença dos inibidores, Figura 8.11.

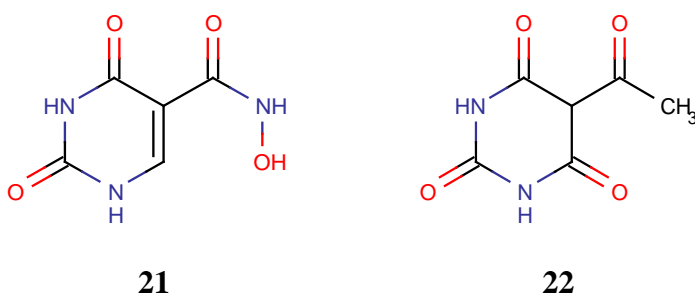


Figura 8.11. Estrutura das substâncias inativas.

Os valores da constante de Michaelis-Menten (K_M), velocidade máxima (V_{max}) e constante de afinidade aparente (K_i^{app}) calculada na presença dos inibidores está representada na Tabela 8.4, além dos valores da eficiência do ligante (LE).

Tabela 8.4. Valores para o K_M , V_{max} , K_i^{app} , número de átomos pesados (HAC), eficiência do ligante (LE) das moléculas testadas, como representadas nas Figuras 8.9, 8.10 e 8.11. Todas as estruturas são mostradas no apêndice.

Moléculas	K_M (μM)	V_{max} ($\mu\text{M s}^{-1}$)	K_i^{app} (μM)	HAC	LE (kcal mol^{-1} átomo $^{-1}$)	Mecanismo
11	$6,41 \pm 1,19$	$5,45 \pm 2,90$	$38,40 \pm 6,19$	16	0,38	<i>Competitivo</i>
12	$6,75 \pm 0,51$	$4,02 \pm 0,84$	$52,60 \pm 3,81$	15	0,39	<i>Competitivo</i>
13	$7,89 \pm 0,51$	$4,22 \pm 0,85$	$163,41 \pm 6,70$	20	0,26	Não competitivo
14	$6,22 \pm 0,62$	$2,29 \pm 0,58$	$188,72 \pm 35,07$	14	0,36	<i>Competitivo</i>
15	$6,99 \pm 0,67$	$4,06 \pm 0,11$	$149,79 \pm 22,02$	12	0,43	<i>Competitivo</i>
16	$9,75 \pm 0,82$	$2,58 \pm 0,73$	$124,97 \pm 12,79$	12	0,44	<i>Competitivo</i>
17	$7,07 \pm 1,15$	$2,31 \pm 0,11$	$154,52 \pm 39,40$	16	0,32	<i>Competitivo</i>
18	$4,78 \pm 0,94$	$1,11 \pm 0,49$	$94,69 \pm 24,78$	15	0,37	<i>Competitivo</i>
19	$9,81 \pm 0,84$	$2,59 \pm 0,74$	$118,42 \pm 11,90$	17	0,31	<i>Competitivo</i>
20	$4,67 \pm 0,49$	$4,15 \pm 0,94$	$0,121 \pm 0,014$	17	0,55	<i>Competitivo</i>
21	$8,69 \pm 0,83$	$2,52 \pm 0,73$	$1670,82 \pm 176,60$	-	-	Inativo
22	$6,86 \pm 0,55$	$3,52 \pm 0,73$	$1358,46 \pm 73,89$	-	-	Inativo

Dos inibidores encontrados, apenas a substância **13** inibiu a enzima de forma não-competitiva, provavelmente interagem em um sítio distinto do sítio ativo, podendo estar na região S3 e S4, inativando o movimento da alça ativa para a entrada dos substratos, tornando o processo catalítico ineficiente. Esta hipótese só pode ser confirmada após a obtenção e resolução da estrutura cristalográfica do complexo

enzima-inibidor. Os parâmetros estatísticos dos dados referentes à Tabela 8.4 estão descritos na Tabela 8.5.

Tabela 8.5. Parâmetros estatísticos dos ajustes das representadas nas Figuras 8.9, 8.10 e 8.11 com os valores de K_i^{app} (em μM) das substâncias testadas contra a TcDHODH

	Graus de liberdade^a	AICc^b	R²	Soma dos Quadrados	Sy.x^c	Valor teste p^d	K_i^{app} (μM)	Intervalo de confiança
11	35	-952,95	0,95	$3,83 \times 10^{-10}$	$3,31 \times 10^{-6}$	< 0,001	38,40 ± 6,19	25,82 a 50,98
12	37	-1.077,78	0,97	$6,33 \times 10^{-11}$	$1,31 \times 10^{-6}$	< 0,001	52,60 ± 3,81	44,87 a 60,32
13	37	-1.096,04	0,98	$4,01 \times 10^{-11}$	$1,04 \times 10^{-6}$	< 0,001	163,41 ± 6,70	149,82 a 176,99
14	37	-1.106,48	0,95	$3,09 \times 10^{-11}$	$9,13 \times 10^{-6}$	< 0,001	188,72 ± 35,07	117,66 a 259,77
15	37	-1.066,54	0,96	$8,38 \times 10^{-11}$	$8,156 \times 10^{-7}$	< 0,001	149,79 ± 22,02	105,17 a 194,41
16	37	-1.121,75	0,97	$2,11 \times 10^{-11}$	$7,55 \times 10^{-7}$	< 0,500	124,97 ± 12,79	99,05 a 150,89
17	37	-1.069,03	0,92	$7,86 \times 10^{-11}$	$1,46 \times 10^{-6}$	< 0,001	154,52 ± 39,40	74,68 a 234,35
18	37	-928,19	0,92	$2,66 \times 10^{-11}$	$8,48 \times 10^{-6}$	< 0,001	94,69 ± 24,78	44,48 a 144,91
19	37	-1.121,11	0,97	$2,14 \times 10^{-11}$	$7,61 \times 10^{-7}$	< 0,500	118,42 ± 11,90	94,29 a 142,53
20	77	-2.088,05	0,94	$3,32 \times 10^{-11}$	$2,08 \times 10^{-6}$	< 0,001	0,121 ± 0,014	0,094 a 0,148
21	27	-822,29	0,95	$2,71 \times 10^{-11}$	$1,00 \times 10^{-6}$	< 0,500	1670,82 ± 176,60	-
22	37	-1.084,71	0,96	$5,31 \times 10^{-11}$	$1,19 \times 10^{-6}$	< 0,001	1358,46 ± 73,89	-

^a Representa os valores em que os cálculos estatísticos podem variar. ^b Parâmetro relacionado ao ajuste do modelo aos dados experimentais. Quanto menor o valor, melhor o ajuste. ^c Este parâmetro quantifica o tamanho dos resíduos, e quanto menor o seu valor melhor será o ajuste dos dados na regressão não linear.

^d Quanto menor o valor de p , melhor o ajuste do modelo estatístico.

A maioria dos inibidores é reversível e competitivo. Para compreender as bases moleculares deste mecanismo de inibição é preciso descrever o equilíbrio entre a enzima, substrato e o inibidor que pode estar presente na solução como representado no esquema geral na Fig. 8.12. Sendo K_M a constante de Michaelis-Menten, K_i^{app} a constante de dissociação do complexo enzima-inibidor (EI) e V_{max} a velocidade máxima para a formação do produto a partir do complexo enzima-substrato (ES). [15]

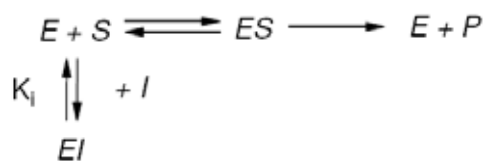


Figura 8.12. Esquema do equilíbrio de uma reação enzimática na presença e ausência de um inibidor competitivo.

A inibição competitiva refere-se ao caso em que o inibidor interage exclusivamente na enzima livre. Nesse tipo de inibição, os dois ligantes (inibidor e substrato) competem pela mesma forma da enzima e interage em sítios mutuamente exclusivos; isto é, a enzima livre se liga ou com o substrato ou com o inibidor, mas nunca com ambos. Nesse tipo de inibição, o inibidor apresenta similaridade estrutural com o substrato ou com o estado de transição da reação.

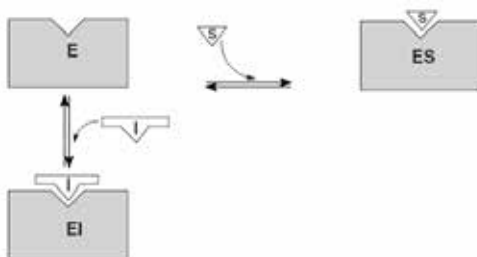


Figura 8.13. Representação esquemática da inibição competitiva. Figura adaptada. ^[15]

Inibidores reversíveis competitivos interagem com a enzima através de forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, ao contrário dos inibidores irreversíveis, que interagem com a enzima através da formação de ligações covalentes.

A molécula mais potente ($K_i^{app} = 0,121 \pm 0,014 \mu\text{M}$) encontrada neste trabalho pertence a essa classe de inibidores competitivos. Além disso, analisando-se novamente a Tabela 8.4 nota-se que os valores para a constante de inibição das substâncias variam de 0,121 a 188,72 μM , com quatro substâncias abaixo de 100 μM e seis entre 100 e 200 μM .

Para se tornar um candidato a composto-matriz, a potência de um ligante precisa ser melhorada, o que quase sempre ocorre em paralelo com um aumento da massa molecular ^[16]. Como mostrado na Fig. 8.14, o aumento do número de átomos pesados de 12 (molécula **1**, da primeira geração) para 17 (molécula **20**, da segunda geração) ocorreu um aumento significativo na potência.

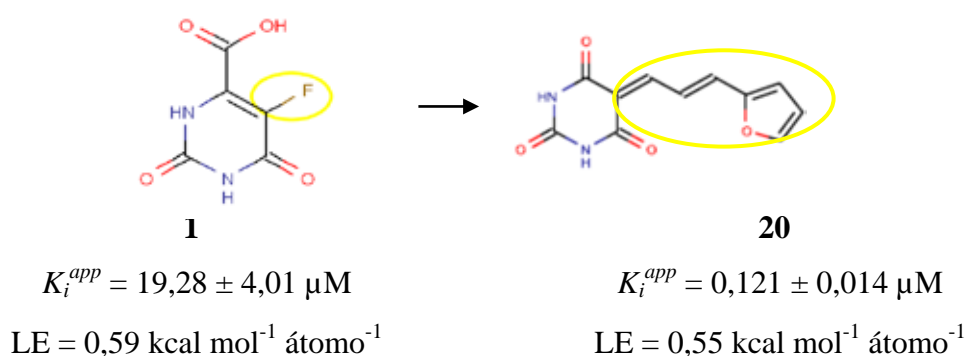


Figura 8.14. Otimização das moléculas da primeira geração (molécula **1**) para os da segunda geração (molécula **20**).

A otimização das moléculas da primeira geração (molécula **1** para a molécula **20**) resultou em um aumento na potência de 159 vezes, mantendo-se a eficiência do ligante. Isso significa que os átomos adicionados contribuem efetivamente para a interação com a enzima TcDHODH, tornando a adição de cada átomo importante para o aumento na afinidade (K_i^{app}) com melhor complementaridade com o sítio da TcDHODH. Estes resultados demonstram o sucesso alcançado no processo de otimização molecular das substâncias da primeira geração, focando no uso conjunto das cavidades S1-S2.

Para que possa ser compreendido o processo de interação do ligante dentro do sítio da proteína, está representado na Figura 8.15 as interações do inibidor mais potente (**20**) com a enzima TcDHODH preditas através da docagem com ajuste induzido. As

interações por doação ou aceitação por ligação de hidrogênio estão no intervalo de 2,20 a 3,80 Å.

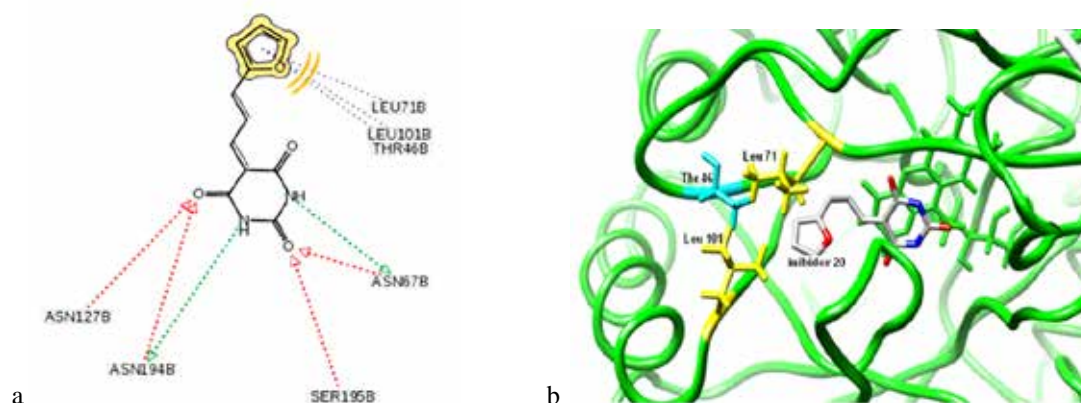


Figura 8.15. Representação do inibidor **20** no sítio da TcDHODH gerado após a docagem molecular; (a) Representação 2D das interações, em amarelo a representação das interações hidrofóbicas com os resíduos Leu71, Leu101, Thr46; em verde estão representadas as interações por doação de ligação de hidrogênio do inibidor com os resíduos Asn 67, Asn194; em vermelho a interação por aceitação de ligação de hidrogênio com os resíduos: Asn 67, Ser 195, Asn 194 e Asn 127; (b) Representação 3D das interações, na qual o inibidor **20** está localizado no sítio S2 e os aminoácidos Leu71, Leu 10, Thr 46 (em amarelo e azul) formam esta região.

Pela análise do modo de interação da substância **20** com o sítio da TcDHODH predito pela docagem, pode-se propor razões para o fato desta molécula ter sido a mais potente da série (Figura 8.15). A molécula conserva a rede de interações feitas dentro do sítio ativo (S1) semelhante às outras moléculas avaliadas na primeira etapa. Entretanto, novas e complementares interações entre o anel furano e o resíduos pertencentes ao sítio S2 são estabelecidas.

A região em amarelo (Figura 8.15b) representa as interações hidrofóbicas que o grupo furano (molécula **20**) faz com os resíduos Leu71, Leu 101, Thr46, altamente hidrofóbicos, que estão presentes no sítio S2 da enzima TcDHODH..

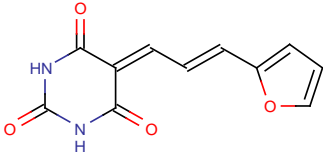
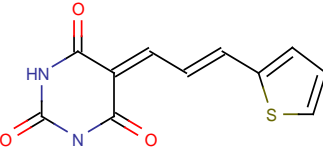
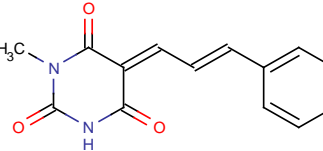
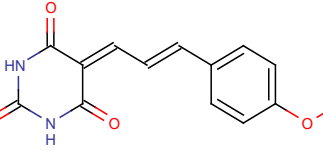
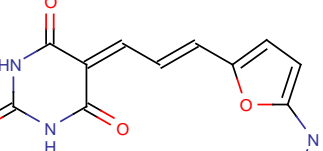
Analisando as Figuras 8.9 e 8.10, podemos dizer que a maioria das substâncias ativas contra a TcDHODH, tem uma dupla exocíclica no C5 do anel pirimidinodiona, conferindo uma certa rigidez no anel. O processo de interação intermolecular a energia livre de Gibbs é regida por dois fatores: entálpico e entrópico. A entalpia depende das

interações específicas (ligações de hidrogênio, iônicas etc.), a entropia da molécula em solução pode ser dividida em: entropia vibracional, rotacional e translacional; no processo de interação ocorre uma contribuição desfavorável da entropia rotacional, pois a molécula perde os graus de liberdade restringidos pelo sítio da enzima. A maior rigidez destas moléculas faz que haja um decréscimo desta mudança entrópica desfavorável rotacional no processo de interação, que não ocorre com as outras moléculas da série e pode ser uma razão para a melhor afinidade.

Além disso, a substância mais potente (Figura 8.15) tem uma conexão hidrofóbica (saindo de C5) com dois C-C de distância para o correto posicionamento do grupo furano em S2. Estas características podem ser fundamentais para o reconhecimento molecular desta substância.

Com base no valor de K_i^{app} e na eficiência do ligante pode-se chegar à conclusão de que a molécula **20** é um excelente inibidor da TcDHODH. Para validação da molécula **20**, foi realizado o teste de quatro novas moléculas com substituintes que pudessem se estender ao longo da cavidade S2 e que mantivessem a estrutura do anel pirimidínico no sítio S1, avaliadas com o uso do ITC (mesmas condições descritas na seção 8.5.1), para determinação do mecanismo de inibição, constante de inibição (K_i^{app}) e cálculo da eficiência do ligante (LE), Tabela 8.6.

Tabela 8.6. Valores para a eficiência do ligante (LE) e K_i^{app} dos inibidores da TcDHODH.

	Substâncias	LE ^a	K_i^{app} (μM)	95 % intervalo de confiança
20		0,55	0,121 ± 0,01	0,094 a 0,148
23		0,54	0,190 ± 0,01	0,090 a 0,210
24		0,36	18,64 ± 1,15	16,53 a 20,76
25		0,31	29,83 ± 1,07	27,71 a 31,96
26		0,29	57,10 ± 7,28	42,53 a 71,67

Parâmetros estatísticos: graus de liberdade: 50; soma dos quadrados: 4.35×10^{-10} ; $Sy.x$ 2.02×10^{-12} ; Valores teste $p < 0.001$ e AICc -658.79. ^aLE: Eficiência do ligante (kcal mol^{-1} átomo⁻¹). Melhor ajuste no modelo competitivo.

As substâncias mostradas na Tabela 8.6 foram ativas contra a TcDHODH, sendo inibidores competitivos com relação ao substrato DHO. A molécula **23**, similar a molécula **20**, também apresentou afinidade nanomolar, porém a diminuição da eletronegatividade dos heteroátomos de oxigênio (molécula **20**) para enxofre (molécula **23**) levou a uma diminuição da potência. Podemos inferir que as substâncias seguem o mesmo padrão de interação, nos sítios S1 e deslocando os demais resíduos em S2.

Entretanto, a substituição do grupo furano (molécula **20**) por grupos mais volumosos do que o tiofeno (molécula **23**) para o benzeno (molécula **24**) não são bem acomodadas pelo sítio. Assim pode-se inferir que existe uma limitação no deslocamento da alça ativa para permitir a complementaridade e redução de contatos desfavoráveis com esta região das moléculas. A perda de afinidade pela TcDHODH das moléculas **24** e **25** podem estar relacionada ao fato de que o sítio S2 acomode preferencialmente, devido ao seu volume, substituintes cíclicos com até cinco carbonos.

Os resultados de inibição enzimática obtidos com a técnica de ITC indicam que o planejamento realizado na seleção das moléculas foi bem sucedido, considerando apenas as substâncias com $K_i^{app} < 100 \mu\text{M}$ a taxa de acerto é de 46%. Este é um número excelente, já que vários trabalhos têm mostrado que a taxa de acerto gira em torno de 1-10% usando métodos computacionais de ensaio *in silico* e cerca de 0,2% para ensaios em larga escala (HTS)^[17,18].

8.6. Referências

- [1] COPELAND, R. A. **Enzymes**: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis. New York: Wiley-VCH, 2000. 397 p.
- [2] COPELAND, R. A. **Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery**. New Jersey: Wiley-VCH, 2005. 296 p.
- [3] SYSTAT SOFTWARE. **Signaplot 10**. [Programa de Computador]. Richmond: [s.n], 2006. 1 CD-ROM.
- [4] American Chemical Society, **SciFinder Scholar**. [Programa de Computador]. Columbus: [s.n], 2007 1 CD-ROM.
- [5] CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.
- [6] PETERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, 2004.
- [7] CHELESKI, J.; ROCHA, J. R.; PINHEIRO, M. P.; WIGGERS, H. J.; DA SILVA, A. B. F.; NONATO, M. C.; MONTANARI, C. A. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, n. 12, p. 5899-5909, 2010.

- [8] HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Discov. Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.
- [9] SIEGAL, G.; AB, E. Integration of fragment screening and library design. **Drug Discov. Today**, v. 12, n. 23, p. 1032-1039, 2007.
- [10] CARR, R. A. E.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; REES, D. C. Fragment-based lead discovery: leads by design. **Drug Discov. Today**, v. 10, n. 14, p. 987-992, 2005.
- [11] LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 23, n. 1, p. 3-25, 1997.
- [12] LEACH, A. R.; HANN, M. M.; BURROWS, J. N.; GRIFFEN, E. J. Fragment screening: an introduction. **Mol. Biosyst.**, v. 2, n. 9, p. 429-426, 2006.
- [13] REES, D. C.; CONGREVE, M.; MURRAY, C. W.; CARR, R. Fragment-based lead discovery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 8, p. 660-672, 2004.
- [14] HADJUK, P.; GREER, J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 6, n. 3, p. 211-219, 2007.
- [15] Segel, I. H. Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. New York: Wiley, 2006. 957p.
- [16] HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R.; ALEX, A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. **Drug Disc. Today**, v. 9, n. 10, p. 430-431, 2004.
- [17] SHOICHET, B. K. Virtual screening of chemical libraries. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 862-865, 2004.
- [18] SHOICHET, B.; K.; MCGOVERN, S.; L.; WEI, B.; IRWIN, J. Lead discovery using molecular docking. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 6, n. 4, p. 439-446, 2002.

Capítulo 9

Conclusões e Perspectivas



Este capítulo apresenta as conclusões desta tese de doutorado que envolveu o uso de métodos em quiminformática e experimentais na identificação de novos inibidores da enzima TcDHODH. Além disso, são apresentadas as perspectivas para a continuação deste trabalho.

9. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

9.1. Conclusões

A doença de Chagas é uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo. Apesar dos impactos socioeconômicos negativos, da diminuição da qualidade de vida e dos efeitos severos ao organismo causados pela doença de Chagas, esta completou 100 anos em 2009, de sua descoberta, sendo que não há um tratamento eficaz e seguro. Os únicos fármacos disponíveis para o tratamento dessa doença foram introduzidos há mais de quarenta anos e apresentam uma série de efeitos colaterais, além de serem eficazes apenas na fase aguda da doença. Nesse contexto, a busca por novas moléculas mais eficazes e menos tóxicas é essencial para aliviar o sofrimento de milhões de pessoas que estão infectadas por essa doença.

A identificação de novas substâncias capazes de modular a atividade da enzima TcDHODH, alvo que desempenha função metabólica importante para a sobrevivência do parasito *T. cruzi*, foi realizada com sucesso neste trabalho através a utilização dos métodos em quiminformática aliados aos métodos experimentais. A quiminformática, com o desafio de encontrar substâncias biologicamente ativas através da descrição e delimitação do espaço químico-biológico, permitiu a seleção de substâncias ativas dentro de grandes coleções de moléculas.

O método escolhido para a determinação do mecanismo de inibição e constante de inibição (K_i^{app}) das moléculas foi a Titulação Calorimétrica Isotérmica ultra-sensível (ITC), que forneceu dados cinéticos precisos. Além disso, técnica de ITC mostrou ser extremamente sensível, permitindo-se acompanhar a cinética da reação e obter os valores de K_i^{app} de maneira acurada, na qual foi possível determinar a diferença dos valores de afinidade dos inibidores na ordem de nanomolar. Também, diferente do método espectrofotométrico, a técnica de ITC pode ser usada em soluções opacas e não

necessita que o substrato contenha grupos cromóforos, fluoróforos ou necessitem de reações acopladas.

Em paralelo a este trabalho, também se desenvolveu um novo protocolo de expressão para outra importante enzima do *T. cruzi*, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, de uma maneira rápida, de fácil purificação, alto rendimento e com significativa estabilidade, que possibilitará aos membros do Grupo Nequimed a realização dos ensaios bioquímicos de novos inibidores de maneira reprodutiva e eficaz.

O protocolo de ensaio bioquímico desenvolvido utilizando ITC, para a determinação dos parâmetros cinéticos de reação obtidos para as enzimas DHODHs de *T. cruzi* e *L. major* em relação aos dois substratos (DHO e FUM), nos ajudou a elucidar o comportamento cinético destas enzimas e a elucidar a afinidade dos substratos. Para a enzima TcDHODH foi feito um estudo adicional, frente a diferentes tampões, temperaturas e na presença do cossolvente DMSO e do surfactante Triton X-100, e assim, foi estabelecido um protocolo de ensaio cinético para que possa ser incluído moléculas com baixa solubilidade em água ou que venham a agregar.

Das vinte e seis substâncias testadas durante o projeto, dezenove inibiram a TcDHODH competitivamente. Destas, duas substâncias tiveram suas estruturas cristalográficas resolvidas (códigos PDB: 3MJY e 3MHU), e desta maneira, os modos de interação elucidados.

Estes resultados nos indicaram a possibilidade de buscar por novas moléculas, em regiões que se estenderam além do sítio ativo (S1), na nova região, que chamamos de S2. Esta região, nunca antes explorada para as enzimas DHODHs, não está presente na enzima DHODH de humanos. Assim, moléculas capazes de interagir em S1 e S2 poderão ser seletivas para as enzimas da Classe 1A. Seguindo esta hipótese, a segunda

geração de moléculas, gerou substâncias com afinidade nanomolar, nunca antes descrito na literatura para as enzimas DHODHs.

Com isso, a taxa de acerto obtida nesta tese, considerando as substâncias com $K_i^{app} < 100 \mu\text{M}$, foi de 46%, um número significativo considerando-se apenas as substâncias ensaiadas, já que na literatura ele gira em torno de 1-10% quando o planejamento *in silico* é realizado e se comparado às taxas de acerto obtidas através dos métodos de ensaio em larga escala (HTS), de 0-2 %, os resultados alcançados neste trabalho são ainda mais expressivos. Atribuímos o desta seleção a integração de diferentes tecnologias: uso dos métodos em quiminformática para seleção das moléculas, da biologia molecular para a obtenção do alvo biomacromolecular, dos ensaios bioquímicos utilizando a ITC e a determinação da estrutura do complexo enzima/inibidor utilizando cristalografia de raios X.

Além da alta afinidade das substâncias, se observamos a eficiência do ligante, podemos dizer que estas moléculas se caracterizam como ótimas candidatas para seguirem na próxima etapa da gênese planejada de fármacos. Com este trabalho, esperamos dar uma importante contribuição para o futuro da quimioterapia da doença de Chagas, encontrando-se novos inibidores potentes pela enzima DHODH de *T. cruzi*.

9.2. Perspectivas

A etapa posterior da gênese planejada de fármacos é a otimização dos ligantes descritos neste trabalho em substâncias-matrizes. Para isso, novas estruturas químicas com base nas moléculas mais potentes foram selecionadas e estão sendo sintetizadas. Em paralelo, será utilizada a técnica de cristalografia de raios X para a determinação estrutural do complexo enzima/inibidor, fornecendo informações sobre o modo de interação (MOB). As substâncias estão sendo testadas contra as formas infectivas do *T. cruzi*, na Escola de Medicina de Ribeirão Preto - USP, sob a coordenação do Prof. Dr. João Santana. As substâncias que forem ativas no parasito *T. cruzi* com melhor resposta do que o fármaco Benzonidazol serão avaliadas nos testes de toxidez. Primeiramente, os testes de toxidez serão realizadas em células de mamíferos para avaliar os índices de segurança. Uma vez validada a classe química, os seguintes testes de toxidez seguem para o modelo animal, que devem ser realizados em pelo menos dois mamíferos.

Os estudos não clínicos de segurança no Brasil são propostos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e são descritos no: “*Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos, Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia -GESEF- ANVISA 2010*” e incluem os estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e carcinogenicidade além de estudos para a avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (Administração, Distribuição, Metabolismo e Excreção – ADME).

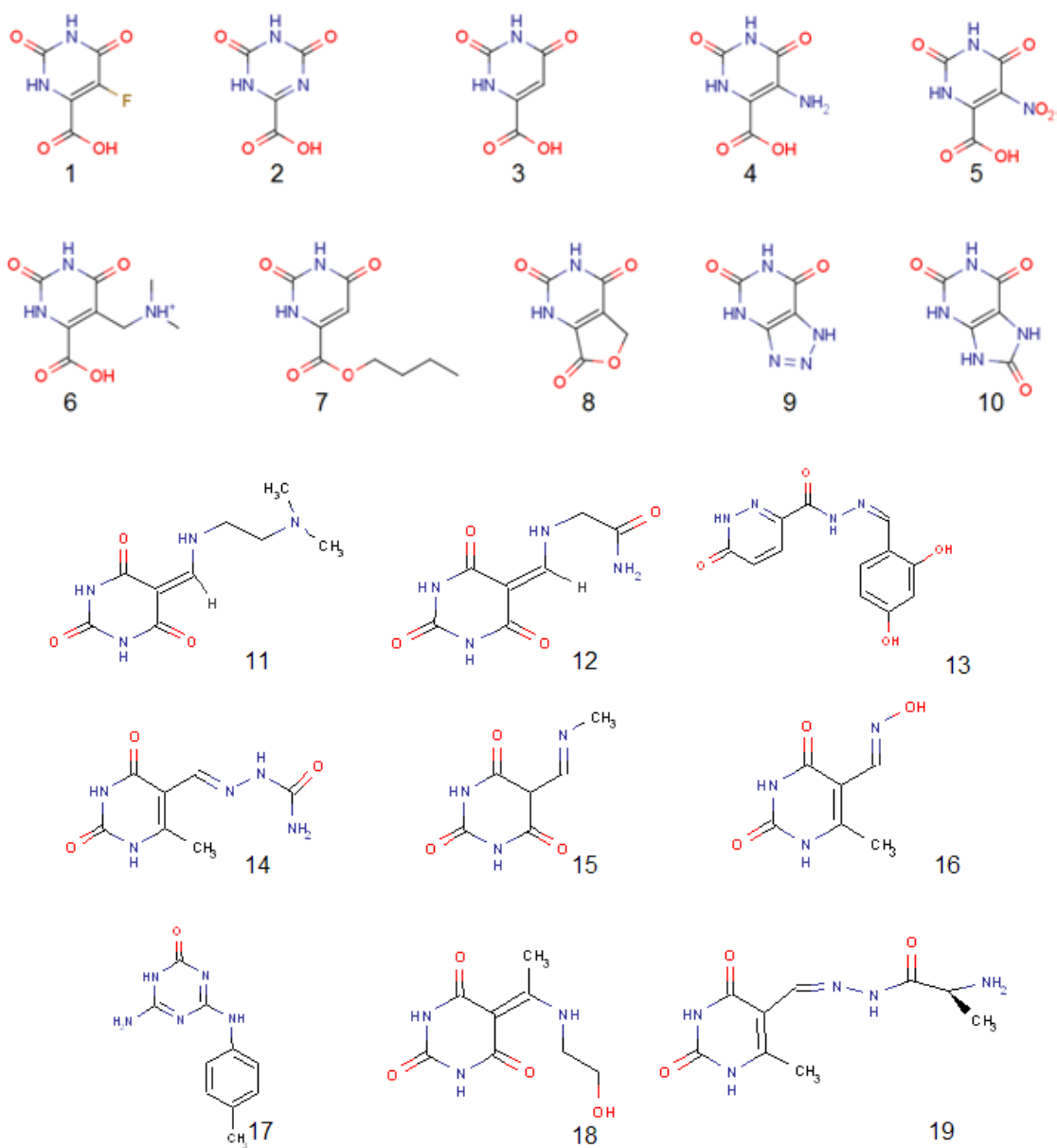
Uma vez comprovada a segurança dessas substâncias, os dados poderão ser apresentados e avaliados pela ANVISA, fornecendo subsídios para dar início as Pesquisas Clínicas.

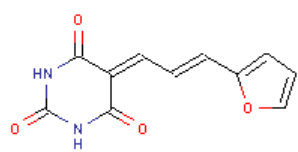
Apêndices



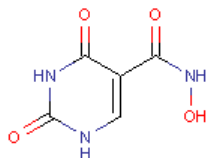
ANEXO 1

Numeração das substâncias testadas contra a enzima TcDHODH:

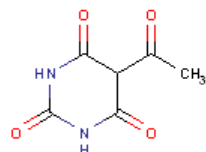




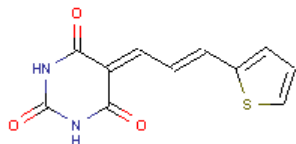
20



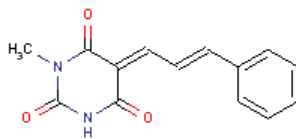
21



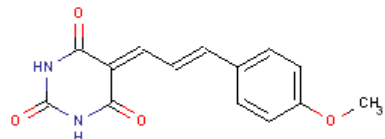
22



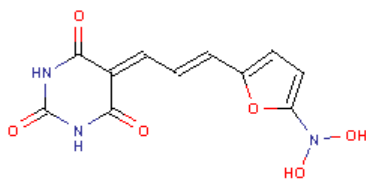
23



24



25



26

Numeração utilizada na tese	Numeração do Banco de dados do grupo <i>Nequimed</i>
1	Nequimed 63
2	Nequimed 62
3	Nequimed 61
4	Nequimed 59
5	Nequimed 66
6	Nequimed 73
7	Nequimed 56
8	Nequimed 75
9	Nequimed 143
10	Nequimed 144
11	Nequimed 58
12	Nequimed 133
13	Nequimed 134
14	Nequimed 60
15	Nequimed 65
16	Nequimed 68
17	Nequimed 145
18	Nequimed 72
19	Nequimed 70
20	Nequimed 71
21	Nequimed 74
22	Nequimed 67
23	Nequimed 130
24	Nequimed 131
25	Nequimed 132
26	Nequimed 146



Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Kinetic mechanism and catalysis of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase enzyme evaluated by isothermal titration calorimetry

Juliana Cheleski^a, Helton José Wiggers^b, Ana Paula Citadini^c, Antônio José da Costa Filho^c, Maria Cristina Nonato^d, Carlos Alberto Montanari^{a,b,*}

^a Grupo de Química Medicinal de Produtos Naturais, NEQUIMED-PN, Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, 13565-905 São Carlos, SP, Brazil

^c Grupo de Biofísica Molecular Sérgio Mascarenhas, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^d Laboratório de Cristalografia de Proteínas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 August 2009

Received in revised form 14 November 2009

Accepted 15 November 2009

Available online 20 November 2009

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Dihydroorotate dehydrogenase

Enzyme kinetics

Activation thermodynamic parameters

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase (TcDHODH) catalyzes the oxidation of L-dihydroorotate to orotate with concomitant reduction of fumarate to succinate in the *de novo* pyrimidine biosynthetic pathway. Based on the important need to characterize catalytic mechanism of TcDHODH, we have tailored a protocol to measure TcDHODH kinetic parameters based on isothermal titration calorimetry. Enzymatic assays lead to Michaelis–Menten curves that enable the Michaelis constant (K_M) and maximum velocity (V_{max}) for both of the TcDHODH substrates: dihydroorotate ($K_M = 8.6 \pm 2.6 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 4.1 \pm 0.7 \mu\text{M s}^{-1}$) and fumarate ($K_M = 120 \pm 9 \mu\text{M}$ and $V_{max} = 6.71 \pm 0.15 \mu\text{M s}^{-1}$). TcDHODH activity was investigated using dimethyl sulfoxide (10%, v/v) and Triton X-100 (0.5%, v/v), which seem to facilitate the substrate binding process with a small decrease in K_M . Arrhenius plot analysis allowed the determination of thermodynamic parameters of activation for substrates and gave some insights into the enzyme mechanism. Activation entropy was the main contributor to the Gibbs free energy in the formation of the transition state. A factor that might contribute to the unfavorable entropy is the hindered access of substrates to the TcDHODH active site where a loop at its entrance regulates the open–close channel for substrate access.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Chagas disease or American trypanosomiasis, caused by the flagellate protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, has been considered one of the most neglected diseases in the world. The available control strategy has not fully helped to reduce disease burden. Despite Brazil's efforts to control this disease, a large segment of the population still suffers from its effects [1]. The most recent estimate data from the Disease Control Priorities Project of the National Institutes of Health and World Bank indicate an overall number of 9.8 million people infected with *T. cruzi* [2].

The progression of this disease can lead to symptoms such as inflammatory cardiomyopathy, neural disorders, and digestive injuries. A large percentage of Chagas patients receive no specific antiparasitic therapy because of the ineffectiveness and toxicity of the pharmacological agents in use (nifurtimox and benznidazole). Hence, better therapeutic agents and novel drug targets need to be developed, but when focusing on the challenges facing drug

target selection and characterization, care must be taken before the search for active compounds can begin. This means that we must, for instance, describe the biochemical mechanism of targets to achieve active site complementarity (steric, electrostatic, and hydrophobic).

Trypanosoma cruzi dihydroorotate dehydrogenase (TcDHODH,¹ EC 1.3.99.11) catalyzes a coupled redox reaction in which dihydroorotate (DHO) is oxidized to orotate and fumarate is reduced to succinate. This is the fourth enzymatic step in the pyrimidine *de novo* biosynthetic pathway [3]. Although the enzymatic function of dihydroorotate dehydrogenases (DHODs) is conserved in all organisms, the enzymes in prokaryotic and eukaryotic organisms are quite different [4].

Based on amino acid sequence identity, DHODs have been classified into two families referred to as family 1 and family 2. Family

* Corresponding author. Address: Grupo de Química Medicinal de Produtos Naturais, NEQUIMED-PN, Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil. Fax: +55 16 3373 9985.

E-mail address: montana@iqsc.usp.br (C.A. Montanari).

¹ Abbreviations used: TcDHODH, *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase; DHO, dihydroorotate; DHOD, dihydroorotate dehydrogenase; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; ITC, isothermal titration calorimetry; DMSO, dimethyl sulfoxide; IPTG, isopropyl β -D-thiogalactoside; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis; UV, ultraviolet; HTS, high-throughput screening; FMN, flavin mononucleotide.



Effects of organic solvents on the enzyme activity of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in calorimetric assays

H.J. Wiggers^a, J. Cheleski^a, A. Zottis^b, G. Oliva^b, A.D. Andricopulo^b, C.A. Montanari^{a,*}

^a Departamento de Química e Física Molecular, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

Received 7 May 2007

Available online 6 July 2007

Abstract

In drug discovery programs, dimethyl sulfoxide (DMSO) is a standard solvent widely used in biochemical assays. Despite the extensive use and study of enzymes in the presence of organic solvents, for some enzymes the effect of organic solvent is unknown. Macromolecular targets may be affected by the presence of different solvents in such a way that conformational changes perturb their active site structure accompanied by dramatic variations in activity when performing biochemical screenings. To address this issue, in this work we studied the effects of two organic solvents, DMSO and methanol (MeOH), in the isothermal titration calorimetry (ITC) kinetic assays for the catalyzed reaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from *Trypanosoma cruzi*. The solvent effects on *T. cruzi* GAPDH had not yet been studied. This enzyme was shown here to be affected by the organic solvents content up to 5.0% for MeOH and up to 7.5% for DMSO. The results show that when GAPDH is assayed in the presence of DMSO (5%, v/v) using the ITC experiment, the enzyme exhibits approximately twofold higher activity than that of GAPDH with no cosolvent added. When MeOH (5%, v/v) is the cosolvent, the GAPDH activity is sixfold higher. The favorable effects of the organic solvents on the Michaelis–Menten enzyme–substrate complex formation ensure the consistency of the biological assays, structural integrity of the protein, and reproducibility over the measurement time. The reaction was also kinetically monitored by standard spectrophotometric assays to establish a behavioral performance of *T. cruzi* GAPDH when used for screening of potential inhibitors.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chagas disease; Isothermal titration calorimetry; Enzyme kinetics; Organic solvents

Traditional and high-throughput screening techniques are widely employed for the identification of hits and leads for a large number of relevant drug targets. Compatible and integrated systems for measurements of biological activity are a vital component in all stages of the drug discovery and development process. The use of calorimetry to directly measure the heat change associated with thermodynamics for biomolecular processes in buffered solutions is of utmost importance [1]. Because the process needs to be rationalized and automated for the potential low solubility of some chemical hits (not all chemical hits are poorly

soluble), dimethyl sulfoxide (DMSO)¹ is the standard solvent used for preparing stock solutions of compounds for biological screens and assays. This is due mostly to the favorable DMSO solubility of chemically diverse organic compounds, low sensitivity and reactivity in screening assays, and low vapor pressure [2].

One of the challenges in the process of taking a hit to a lead in drug discovery involves the optimization of target binding affinity and selectivity, which usually are directly

¹ Abbreviations used: DMSO, dimethyl sulfoxide; ITC, isothermal titration calorimetry; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; G3P, D,L-glyceraldehyde-3-phosphate; 1,3-DPG, 1,3-diphosphoglycerate; MeOH, methanol; TEA, triethanolamine; SIM, single injection method; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid.

* Corresponding author. Fax: +55 16 3373 9985.

E-mail address: montana@iqsc.usp.br (C.A. Montanari).



Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep

Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*

Juliana Cheleski^a, Renato F. Freitas^a, Helton José Wiggers^{a,b}, Josmar R. Rocha^a, Ana Paula Ulian de Araújo^c, Carlos A. Montanari^{a,b,*}

^a Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais – NEQUIMED-PN, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sancarlenense, 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil

^b Departamento de Química – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos – SP, Brazil

^c Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos – SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 July 2010

and in revised form 22 November 2010

Available online 4 December 2010

Keywords:

Trypanosoma cruzi Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Escherichia coli expression
 Kinetic parameters
 Experimental design
 Isothermal titration calorimetry
 Chagas' disease

ABSTRACT

Trypanosomes are flagellated protozoa responsible for serious parasitic diseases that have been classified by the World Health Organization as tropical sicknesses of major importance. One important drug target receiving considerable attention is the enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease (*T. cruzi* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH); EC 1.2.1.12). TcGAPDH is a key enzyme in the glycolytic pathway of *T. cruzi* and catalyzes the oxidative phosphorylation of D-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) to 1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) coupled to the reduction of oxidized nicotinamide adenine dinucleotide, (NAD⁺) to NADH, the reduced form. Herein, we describe the cloning of the *T. cruzi* gene for TcGAPDH into the pET-28a(+) vector, its expression as a tagged protein in *Escherichia coli*, purification and kinetic characterization. The His₆-tagged TcGAPDH was purified by affinity chromatography. Enzyme activity assays for the recombinant His₆-TcGAPDH were carried out spectrophotometrically to determine the kinetic parameters. The apparent Michaelis–Menten constant (K_m^{app}) determined for D-glyceraldehyde-3-phosphate and NAD⁺ were 352 ± 21 and 272 ± 25 μ M, respectively, which were consistent with the values for the untagged enzyme reported in the literature. We have demonstrated by the use of Isothermal Titration Calorimetry (ITC) that this vector modification resulted in activity preserved for a higher period. We also report here the use of response surface methodology (RSM) to determine the region of optimal conditions for enzyme activity. A quadratic model was developed by RSM to describe the enzyme activity in terms of pH and temperature as independent variables. According to the RMS contour plots and variance analysis, the maximum enzyme activity was at 29.1 °C and pH 8.6. Above 37 °C, the enzyme activity starts to fall, which may be related to previous reports that the quaternary structure begins a process of disassembly.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Chagas' disease (American trypanosomiasis) affects around 9.8 million in the tropical region from South America to the southern United States, as recently estimated by the Disease Control Priorities Project of the National Institute of Health and World Bank [1–3]. The disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. There is an urgent need for new, effective and affordable drugs against this disease because the existing drug treatment for Chagas' disease based on nifurtimox (LampitTM,

Bayer) and benznidazole (RochaganTM, RadanilTM, Roche), has very poor efficacy, high toxicity and serious side effects [4].

The great dependence of trypanosomatids on glycolysis to obtain energy makes glycolytic enzymes attractive targets for drug design against Chagas' disease [5,6]. *T. cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TcGAPDH,¹ EC 1.2.1.12) which catalyzes the oxidative phosphorylation of D-glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) to 1,3-bisphosphoglycerate (1,3-BPG) coupled to reduction of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) to NADH, is a key enzyme in the glycolytic pathway [7].

¹ Abbreviations used: TcGAPDH, *Trypanosoma cruzi* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NAD⁺, nicotinamide adenine dinucleotide; G3P, D,L-glyceraldehyde-3-phosphate; 1,3-BPG, 1,3-diphosphoglycerate; DMSO, dimethyl sulfoxide; ITC, isothermal titration calorimetry; TEA, triethanolamine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; Ni-NTA, nickel-nitrilotriacetic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; UV, ultraviolet; IPTG, isopropyl- β -D-thiogalactoside; RSM, response surface methodology.

* Corresponding author at: Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais – NEQUIMED-PN, Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sancarlenense, 400, 13560-970 São Carlos, SP, Brazil. Fax: +55 16 3373 9985.

E-mail address: montana@iqsc.usp.br (C.A. Montanari).



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1A inhibitors discovery

Juliana Cheleski^a, Josmar R. Rocha^a, Matheus P. Pinheiro^b, Helton José Wiggers^a, Albérico B.F. da Silva^a, Maria C. Nonato^{b,*}, Carlos A. Montanari^{a,*}^a Grupo de Estudos em Química Medicinal de Produtos Naturais, NEQUIMED-PN, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, Av. Trabalhador Sarcartense 400, 13560-970, São Carlos–SP, Brazil^b Laboratório de Cristalografia de Proteínas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 July 2010

Received in revised form

21 September 2010

Accepted 23 September 2010

Available online 7 October 2010

Keywords:

Isothermal titration calorimetry

Virtual screening

Chagas' disease

Dihydroorotate dehydrogenase (DHODH)

*Trypanosoma cruzi**Leishmania major*

ABSTRACT

The enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) has been suggested as a promising target for the design of trypanocidal agents. We report here the discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* DHODH identified by a combination of virtual screening and ITC methods. Monitoring of the enzymatic reaction in the presence of selected ligands together with structural information obtained from X-ray crystallography analysis have allowed the identification and validation of a novel site of interaction (S2 site). This has provided important structural insights for the rational design of *T. cruzi* and *Leishmania major* DHODH inhibitors. The most potent compound (1) in the investigated series inhibits TcDHODH enzyme with K_i^{app} value of 19.28 μ M and possesses a ligand efficiency of 0.54 kcal mol⁻¹ per non-H atom. The compounds described in this work are promising hits for further development.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Parasitic protozoa infect millions of people every year and are some of the most important causes of human sickness, death, mutilation and debilitation. The protozoan order kinetoplastida contains species of the genus *Leishmania* that cause Leishmaniasis and also includes the genus *Trypanosoma*, species that cause Chagas' disease [1,2].

Leishmaniasis (a set of trypanosomal diseases caused by various species of *Leishmania*) has a worldwide distribution most spread in Central and South America, southern Europe, North and East Africa, the Middle East, and the Indian subcontinent. Transmission of Leishmaniasis mostly occurs via the bite of an infected phlebotomine sandfly and can also be transmitted through blood transfusions [3,4]. The pharmacotherapies remain limited, in terms of toxicity, efficacy and by their relative high cost in developing countries [5].

Chagas' disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is one of the major health problems in several countries of Latin America, extending to southern United States [6]. Despite

Brazil's efforts to control this disease, a large segment of the population still suffers from its effects [7–10].

The most recent estimated data from the Disease Control Priorities Project of the National Institutes of Health and World Bank indicate an overall number of 9.8 million people infected with *T. cruzi* [11]. The only two available drugs (nifurtimox and benznidazole) have several drawbacks such as poor efficacy and multiple side effects. Hence, more effective and safer drugs for human use must be developed.

Knowledge of the biochemistry of *T. cruzi* has revealed new potential targets for chemotherapy intervention. One such important drug target receiving considerable attention is the *T. cruzi* flavoenzyme dihydroorotate dehydrogenase (TcDHODH; EC 1.3.99.11), which catalyzes a coupled redox reaction in which dihydroorotate is oxidized to orotate and fumarate is reduced to succinate [12,13]. In DHODH knockout studies, *T. cruzi* did not express the enzyme protein and could not survive even in the presence of pyrimidine nucleosides, confirming its dependence on *de novo* biosynthesis [14].

In this article, we report the discovery of novel TcDHODH inhibitors by combined use of Isothermal Titration Calorimetry (ITC), virtual screening and X-ray crystallography techniques. Heat changes are a fundamental part of binding events and biochemical reactions. ITC has been extensively used to study thermodynamic

* Corresponding authors. Tel.: +55 16 3373 9986; fax: +55 16 3373 9985.
E-mail address: montana@iqsc.usp.br (Carlos A. Montanari).