



PATRÍCIA SOARES DE MARIA DE MEDEIROS

**ESTUDO CINÉTICO DA ENZIMA 2-TRANS-ENOIL-ACP-REDUTASE
(E.C. 1.3.1.9) DE *Plasmodium falciparum* E ENSAIOS DE INIBIÇÃO PELO
COMPOSTO PENTACIANO (ISONIAZIDA) FERRATO II**

Tese de Doutorado apresentada à Fundação
Universidade Federal de Rondônia, como
requisito para obtenção do título de Doutor
em Biologia Experimental.

Porto Velho - RO

2011



PATRÍCIA SOARES DE MARIA DE MEDEIROS

**ESTUDO CINÉTICO DA ENZIMA 2-TRANS-ENOIL-ACP-REDUTASE
(E.C. 1.3.1.9) DE *Plasmodium falciparum* E ENSAIOS DE INIBIÇÃO PELO
COMPOSTO PENTACIANO (ISONIAZIDA) FERRATO II**

Tese de Doutorado apresentada à Fundação Universidade Federal de Rondônia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Experimental.

Área de concentração: Parasitologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Hildebrando
Pereira da Silva
Co-orientador: Dr. Rodrigo Gay Ducati

Porto Velho – RO

2011

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

M4885e Medeiros, Patrícia Soares de Maria de

Estudo cinético da enzima 2-Trans-Enoil-Acp-Redutase (E.C.13.1.9) de *Plasmodium falciparum* e ensaios de inibição pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II. / Ederson Lauri Leandro. Porto Velho, Rondônia, 2011.
112f.: il.

Tese (Doutorado em Biologia Experimental) Fundação Universidade Federal de Rondônia / UNIR.

Orientador: Prof. PhD. Luiz Hildebrando Pereira da Silva.

1. Malária 2. *Plasmodium falciparum* 3. PfENR 4. 2-Trans-Enoil-ACP-Redutase
5. Pentaciano (isoniazida) I. Silva, Luiz Hildebrando Pereira da II. Título.

CDU: 614

Ao meu marido, João Medeiros, e filhos, Amanda, João Pedro e João Vitor, por dividirem comigo a experiência mais fantástica da vida, o viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de conhecer um pouco mais sobre a química da vida.

Ao Prof. Dr. Luiz Hildebrando pela oportunidade a mim concedida de receber suas orientações mais uma vez.

Ao Prof. Dr. Luiz Augusto Basso por tudo o que aprendi sobre cinética enzimática durante a realização deste trabalho, e pela orientação dos passos de bancada.

Ao Prof. Dr. Diógenes por ter me acolhido no CPBMF-PUC, e desta forma, ter possibilitado a concretização deste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Ducati por ter me ensinado a fazer cinética enzimática, investindo longas horas de seu tempo em uma tarefa nada fácil de ser realizada, mas que, definitivamente, rendeu frutos valiosos.

À Dra. Claudia Paiva Nunes, minha amiga Claudinha, agradeço o estímulo, a acolhida e o investimento de força de trabalho na etapa de expressão e purificação da proteína.

Ao Dr. Cristhopher Schneider, pela orientação e acompanhamento dos experimentos de Biologia Molecular contidos na primeira etapa deste trabalho.

Aos jovens pesquisadores José Eduardo Sacconi e Thiago Milech pelo trabalho fundamental durante a etapa de purificação da proteína.

Aos Drs. Rodrigo Stábili e Eduardo Honda pela orientação e acompanhamento das ações e resultados durante as diversas etapas deste trabalho.

Ao MSc. Rudson de Jesus Holanda por ter compartilhado comigo seus conhecimentos de biologia molecular, e ter sido companheiro fiel e persistente em etapa de poucos resultados promissores.

A todo o corpo técnico e de estagiários do CPBMF- PUC/RS, pelo apoio intenso recebido ao longo dos vários períodos de estágio que por lá realizei. Não poderia iniciar a citar nomes, pois cada um, em sua especialidade, ajudou-me um pouco a construir este trabalho.

As amigas e companheiras de Doutorado Elieth e Rosimeire, bem como aos companheiros Elci e Esquerdo, pelo convívio fraterno diário.

A toda a minha família pelo incentivo e pelo afeto que me acompanharam no decorrer desta jornada.

“A procura da verdade é difícil e é fácil, já que ninguém poderá desvendá-la por completo ou ignorá-la inteiramente. Contudo, cada um de nós poderá acrescentar um pouco do nosso conhecimento sobre a natureza e, disto, uma grandeza emergirá.”

Aristóteles, 350 a.C.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária	1
1.2 Agente etiológico	2
1.3 Transmissão.....	3
1.4 Ciclo biológico	3
1.5 A Malária no Brasil e no mundo	6
1.6 Quimioterapia da Malária	7
1.7 Resistência aos antimaláricos	19
1.8 Apicoplasto	24
1.9 Via metabólica de biossíntese dos ácidos graxos em <i>Plasmodium</i>	26
1.10 2- <i>trans</i> -enoil-ACP-redutase (ENR, E.C. 1.3.1.9).....	29
1.11 Complexo Pentaciano (isoniazida) ferrato II	33
2 OBJETIVOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Análise por Bioinformática	37
3.2 Amplificação do gene da PfENR e clonagem em vetor de expressão.....	37
3.3 Aquisição comercial da proteína PfENR	38
3.3.1 Testes de expressão da PfENR clonada em plasmídeo pGS-21a.....	41
3.3.2 Lise celular	42
3.3.3 Purificação da proteína PfENR expressa em pGS-21a	43
3.3.4 Determinação da concentração protéica.....	45
3.3.5 Avaliação da atividade enzimática da PfENR	45
3.4 Velocidade inicial e determinação de parâmetros cinéticos	45
3.5 Equilíbrio de ligação dos ligantes NADH e Butiril-CoA à PfENR	46
3.6 Cinética da PfENR no estado pré-estacionário	48
3.7 Atividade <i>in vitro</i> do composto pentaciano (isoniazida) ferrato II contra PfENR	49
3.8 Cinética de inibição lenta da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II	49

3.9 Mecanismo de inibição da PfENR composto pentaciano (isoniazida) ferrato II.....	50
3.10 Análise de dados	51
4 RESULTADOS.....	55
4.1 Análise por Bioinformática	55
4.2 Expressão e purificação da PfENR em plasmídeo pGS-21a.....	56
4.2.1 Testes de expressão da PfENR clonada em plasmídeo pGS-21a	56
4.2.2 Purificação da proteína PfENR expressa em pGS-21a	57
4.2.3 Determinação da concentração protéica da PfENR	59
4.2.4 Avaliação da atividade enzimática da PfENR	59
4.3 Velocidade inicial e determinação de parâmetros cinéticos	62
4.4 Equilíbrio de ligação dos ligantes NADH e Butiril-CoA à PfENR	64
4.5 Cinética da PfENR no estado pré-estacionário	65
4.6 Atividade <i>in vitro</i> do composto pentaciano (isoniazida) ferrato II	66
4.7 Cinética de inibição lenta da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II	68
4.8 Mecanismo de inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II	69
5 DISCUSSÃO	71
5.1 Desenho racional de fármacos	71
5.2 Parâmetros cinéticos verdadeiros e mecanismo de ação da PfENR	72
5.3 Mecanismo da inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II	80
6 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO I: Artigo científico.....	102

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1: Avaliação da atividade enzimática das amostras de PfENR.....	60
TABELA 2: Valores de K_M para a enoil redutase (ENR) de diferentes organismos..	73
TABELA 3: Caracterização de duas metodologias de trabalho utilizadas em estudos do mecanismo cinético da enzima 2- <i>trans</i> -enoil-ACP-redutase de <i>P. falciparum</i> (PfENR).....	79

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1: Ciclo de vida do parasita da malária.....	4
FIGURA 2: Estruturas dos álcoois quinolínicos.....	9
FIGURA 3: Estruturas da Pamaquina e da Primaquina	11
FIGURA 4: Estruturas dos antifolatos do tipo I, Dapsona e Sulfadoxina, e dos antifolatos do tipo II, Pirimetamina e Trimetoprima	13
FIGURA 5: Estruturas do Proguanil e do Cicloguanil	14
FIGURA 6: Estrutura da Atovaquona.....	15
FIGURA 7: Estruturas da Artemisinina e seus derivados.....	16
FIGURA 8: Biossíntese de ácidos graxos do Tipo II (FAS II).....	28
FIGURA 9: Reação catalisada pela PfENR.....	29
FIGURA 10: Estrutura química da isoniazida e do pentaciano (isoniazida) ferrato II	31
FIGURA 11: Estrutura química da isoniazida e do aduto INH-NAD que inibe a atividade enzimática de MtnhA.....	32
FIGURA 12: Mapa do vetor de expressão pGS-21a.....	39
FIGURA 13: Sequência de aminoácidos das proteínas PfENR selvagem (A) e PfENR sintetizada pela empresa GenScript Corporation (B).....	40

FIGURA 14: Análise em SDS-PAGE da pureza da proteína de fusão enoil-ACP-redutase após a purificação em coluna de níquel.....	41
FIGURA 15: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas PfENR (432 aminoácidos) e MtlnhA (269 aminoácidos).....	56
FIGURA 16: Análise em SDS PAGE 12% da fração solúvel de <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS/ pGS-21a/PfENR.....	57
FIGURA 17: Análise em SDS PAGE 12% das proteínas eluídas em etapa de purificação em cromatografia de afinidade (Ni^{+2}).....	58
FIGURA 18: Análise em SDS PAGE 12% das proteínas eluídas em etapa de purificação em cromatografia de troca aniônica (Mono Q).....	59
FIGURA 19: Análise em SDS PAGE 12% das proteínas PfENR eluídas em etapa de purificação em cromatografia de afinidade (Ni^{+2}).....	61
FIGURA 20: Padrões de intersecção da velocidade inicial da PfENR com NADH (A) ou Crotonoil-CoA (B) como substrato variável.....	62
FIGURA 21: Constante de dissociação global para a formação dos complexos binários PfENR:NADH (A) e PfENR:Butiril-CoA (B).....	64
FIGURA 22: Representação da curva do experimento em <i>stopped-flow</i> referente à conversão $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$	66
FIGURA 23: Inibição tempo-dependente da atividade da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II	67
FIGURA 24: Inibição da PfENR por ação lenta (<i>slow-onset inhibition</i>) pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II.....	68

	Página
FIGURA 25: Inativação em duas etapas da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II.....	70
FIGURA 26: Mecanismo proposto para a reação química catalisada pela PfENR...	76
FIGURA 27: Mecanismos que descrevem a inibição de ligação lenta reversível de reações catalisadas por enzimas.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACP: Proteína acil-carregadora

CoA: Coenzima A

FASII: Sistema de biossíntese de ácidos graxos Tipo II

HPLC: Cromatografia Líquida de alta performance

INH: Isoniazida

IPTG: Isopropil β -D-Tiogalactopiranosídeo

KatG: Catalase-peroxidase

K': Constante de dissociação média

k_{cat}: Constante catalítica

K_d: Constante de dissociação global

kDa: Kilo Daltons

K_i: Constante de inibição

K_i*: Constante de inibição global

K_M: Constante de Michaelis-Menten

k_{obs}: Velocidade aparente de primeira ordem

MtInhA: 2-*trans*-enoil-ACP redutase de *Mycobacterium tuberculosis*

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

DO: Densidade Óptica

PAGE: *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida)

pb: Par de Bases

PfENR: 2-*trans*-enoil-ACP redutase de *Plasmodium falciparum*

pH: Potencial Hidrogeniônico

rpm: Rotação por minuto

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

Tris-HCl: Tris (hidroximetil) Aminometano Hidroclórico

V_{máx}: Velocidade máxima

V₀: Velocidade inicial

WHO: *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

MEDEIROS, Patrícia Soares de Maria de. ESTUDO CINÉTICO DA ENZIMA 2-TRANS-ENOIL-ACP-REDUTASE (E.C.1.3.1.9) DE *Plasmodium falciparum* E ENSAIOS DE INIBIÇÃO PELO COMPOSTO PENTACIANO (ISONIAZIDA) FERRATO II. 2011, 112p. Tese de Doutorado. Fundação Universidade Federal de Rondônia.

A Malária promove um pesado tributo sobre a saúde e a qualidade de vida dos residentes de países intertropicais, afetando um terço da população humana do mundo. Aproximadamente 90% de todas as mortes causadas por malária ocorrem em crianças Africanas com idade inferior a cinco anos. A disseminação da resistência aos fármacos utilizados na quimioterapia causou uma preocupação recente referente à malária, destacando a necessidade urgente por novos medicamentos e novos alvos biológicos. A abordagem moderna para o desenvolvimento de novas compostos químicos contra as doenças complexas, principalmente as doenças endêmicas negligenciadas como malária e tuberculose, é baseada no uso de alvos moleculares definidos. O parasita da malária humana, protozoário do gênero *Plasmodium*, sintetiza ácidos graxos empregando o sistema de biossíntese de ácidos graxos Tipo II (FAS II), ao contrário dos humanos que dependem da via Tipo I (FAS I). O sistema FAS II alonga os precursores acil da membrana celular em *Plasmodium*. A enzima 2-trans-enoil-ACP-redutase (ENR) é um membro do sistema FAS II. Neste trabalho são apresentados dados de cinética em estado estacionário, cinética em estado pré-estacionário, e de espectroscopia de fluorescência em equilíbrio que nos permitiram propor um mecanismo enzimático de deslocamento duplo para a ENR de *P. falciparum* (PfENR). Além disso, o presente estudo avalia também a inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II. Nossos resultados mostraram que este composto é um inibidor de ação lenta (*slow-onset inhibitor*) da atividade de PfENR. Neste mecanismo de ação, um complexo enzima-inibidor inicial é rapidamente formado e, em seguida, sofre uma reação de isomerização lenta para um complexo binário enzima-inibidor, no qual o inibidor é mais fortemente ligado à enzima. Desta forma, o complexo pentaciano (isoniazida) ferratoII representa uma nova classe de compostos líderes para o desenvolvimento de agentes antimaláricos voltados para a inibição da PfENR.

ABSTRACT

MEDEIROS, Patrícia Soares de Maria de. KINETIC STUDY OF 2-TRANS- ENOYL-ACP-REDUCTASE ENZYME (E.C.1.3.1.9) OF *Plasmodium falciparum* AND INHIBITION ASSAYS WITH PENTACYANO (ISONIAZID) FERRATE II COMPOUND. 2011, 112p. Tese de Doutorado. Fundação Universidade Federal de Rondônia.

Malaria promotes a heavy toll on the health and quality of life of the residents of intertropical countries, affecting one third of the world's human population. Approximately 90% of all malarial deaths occurring in African children below the age of 5 years. The spread of resistance to the drugs used in chemotherapy has recently caused concern malaria, regarding underlining the urgent need for new antimalarial drugs and novel biological targets. The modern approach to the development of new chemical entities against complex diseases, especially the neglected endemic diseases such as malaria and tuberculosis, is based on the use of defined molecular targets. The human malaria parasite, protozoan of the genus *Plasmodium*, synthesizes fatty acids employing the Type II fatty acid biosynthesis system (FAS II), unlike humans, that rely on the Type I (FAS I) pathway. The FAS II system elongates acyl fatty acid precursors of the cell membrane in *Plasmodium*. The enzyme 2-trans-enoyl-ACP-reductase (ENR) is a member of the FAS II system. In this work we present steady-state kinetics, pre-steady-state kinetics, and equilibrium fluorescence spectroscopy data that has allowed us to propose a double displacement mechanism for *P. falciparum* ENR (PfENR) enzyme. Moreover, the present study also evaluates the PfENR inhibition by the pentacyano (isoniazid) ferrate II compound. Our results showed that this compound is a slow-onset inhibitor of PfENR enzyme activity. In this mechanism of action an initial enzyme-inhibitor complex is rapidly formed, which then undergoes a slow isomerization reaction to an enzyme-inhibitor binary complex, where the inhibitor is more tightly bound to enzyme. Thus, the inorganic complex pentacyano (isoniazid) ferrate II represents a new class of leading compounds for the development of antimalarial agents focused on the inhibition of PfENR.

1. INTRODUÇÃO:

1.1 - Malária

A malária, também conhecida como *maleita* ou *paludismo*, é uma doença infecciosa presente na história da humanidade provavelmente desde seu surgimento na África há milhões de anos, associada a pântanos, regiões palustres, várzeas e alagadiços (CAMARGO, 1995). O vocábulo **malária** surgiu no século XVIII, vem do italiano, *mal aire*, ar ruim ou nocivo, e **paludismo** vem do latim, *palus*, pântano, porque se acreditava que a causa da enfermidade estivesse no ar insalubre de certas regiões pantanosas (REY, 2001).

A malária apresenta características clínicas inconfundíveis que podem ser reconhecidas no curso de um acesso malárico típico, quais sejam: presença de calafrios seguidos pela sensação de calor, cefaléia intensa; febre alta, e, na fase final do acesso malárico, a sudorese seguida do declínio da temperatura. A pele sofre transpiração abundante que molha a roupa do paciente. Se a doença não for tratada adequadamente, em particular a malária provocada por *Plasmodium falciparum*, o mais virulento dos plasmódios que infectam o homem, pode desenvolver outros quadros como edema pulmonar, complicações renais, icterícia e obstrução de vasos sanguíneos no cérebro (nos casos graves da doença), situação que poderá levar à morte do indivíduo (REY, 2001).

O diagnóstico laboratorial da malária é feito através do exame do sangue periférico ao microscópio de luz. As alternativas à microscopia tradicional são: microscopia de fluorescência, detecção de antígenos parasitários e de anticorpos e reação em cadeia da polimerase – PCR (FERREIRA & ÁVILA, 2001).

1.2 - Agente etiológico

Em 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, médico do exército colonial francês na Argélia, descobriu o agente etiológico da malária, um protozoário que parasita os glóbulos vermelhos do sangue (CAMARGO, 1995). Mais tarde, outros autores descobriram que eram quatro as espécies parasitas da malária que infectam o homem, protozoários atualmente classificados como pertencentes ao Filo *Apicomplexa*, Classe *Aconoidasida*, Ordem *Haemosporida*, Família *Plasmodidae*, Gênero *Plasmodium* (BRANDS, 2009). São eles: *P. falciparum* (Welch, 1897), causador de uma forma grave da doença conhecida como terçã maligna, com acessos febris a intervalos de 36 a 48 horas. Das mortes anuais devidas à malária, mais de 95% são causadas pelo *P. falciparum*; *P. vivax* (Grassi & Feletti 1890), responsável por uma forma menos grave, conhecida como terçã benigna, com ciclo de 48 horas, apresenta o inconveniente de retornar após ter sido aparentemente curada; *P. malariae* (Laveran, 1881), causa a febre quartã, com acessos febris a cada 72 horas e *P. ovale* (Stephens, 1922), causa a febre terçã benigna com ciclo de 48 horas. Os dois últimos são causadores de formas mais atenuadas da doença, sendo que o *P. ovale* apresenta distribuição limitada ao Continente Africano (REY, 2001; CAMARGO, 2003).

O homem é o hospedeiro natural de *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* e *P. ovale*, e, de forma geral, não se infecta com plasmódios de outros mamíferos, aves ou répteis. Entretanto, algumas espécies que causam malária em símios, como *P. simium*, *P. brasilianum*, *P. cynomolgi*, *P. inui* e *P. knowlesi*, já foram implicadas em malária em humanos, tanto em infecções experimentais e acidentais como em infecções naturais. (VYTHILINGAM *et al.*, 2006; COX-SINGH *et al.*, 2008).

1.3 - Transmissão

O vetor é sempre um mosquito fêmea do gênero *Anopheles*, no entanto, das 380 espécies conhecidas de mosquitos desse gênero, apenas cerca de 60 podem transmitir a doença (STANLEY *et al.*, 1991 *apud* FRANÇA *et al.*, 2008).

1.4 - Ciclo biológico

O ciclo de vida do plasmódio inicia-se com a picada de uma pessoa por um mosquito fêmea do gênero *Anopheles*. O mosquito infectado, imediatamente antes de sugar o sangue dos capilares, injeta no local da picada pequena quantidade de saliva com atividade anticoagulante contendo a forma infectante para o homem.

Ciclo assexuado no homem

No momento da picada o mosquito infectado inocula os esporozoítos do plasmódio no ser humano. Os esporozoítos em seguida penetram os vasos sanguíneos e chegam, em geral, entre 15 e 45 minutos pela corrente sanguínea ao fígado, onde invadem os hepatócitos, e, no seu interior, transformam-se em trofozoítas e depois em esquizontes multinucleares (**Figura 1**). Esses, reproduzem-se assexuadamente por esquizogonia, gerando milhares de merozoítos, numa fase que dura seis dias, no caso de *P. falciparum*, e oito dias no caso de *P. vivax*, conhecida como ciclo pré-eritrocítico, em vista de preceder obrigatoriamente à fase de parasitismo sanguíneo. São os merozoítos hepáticos que invadem os eritrócitos, e, desta forma, dão início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos plasmódios: o ciclo esquizogônico eritrocítico que pode repetir-se indefinidamente, provocando a malária clínica, se não for interrompido através do tratamento por

fármacos anti-maláricos ou pelo desenvolvimento de imunidade induzida (JONES, M.K. & GOOD, 2006).

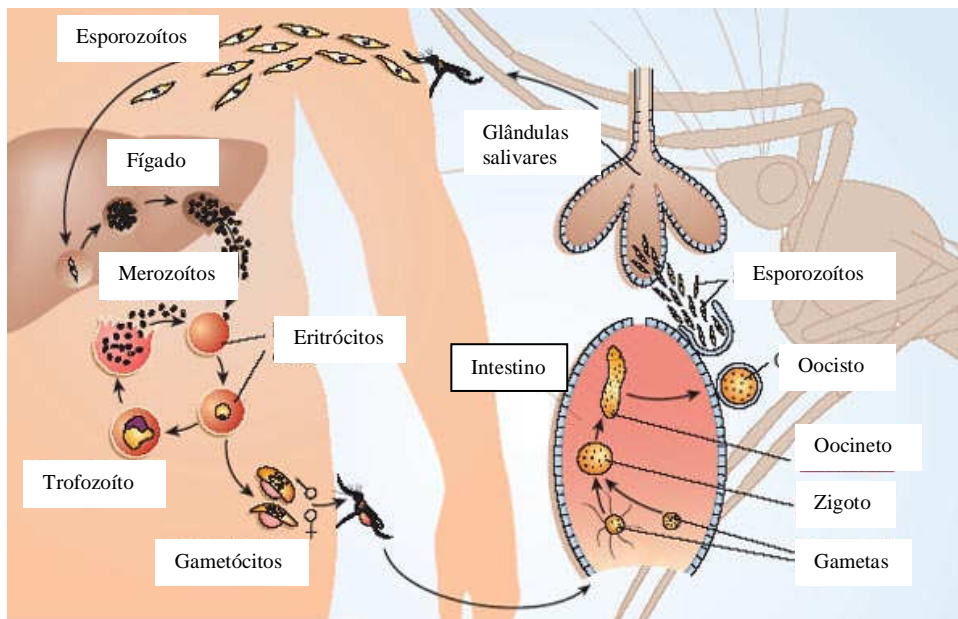


Figura 1: Ciclo de vida do parasita da malária. Ao picar a pele humana o mosquito injeta esporozoítos que penetram os vasos sanguíneos ou linfáticos, chegam ao fígado, invadem os hepatócitos e lá se reproduzem por esquizogonia, gerando milhares de merozoítos. Estes caem novamente na corrente sanguínea, infectam eritrócitos, diferenciam-se em trofozoítos e sofrem o segundo ciclo de esquizogonia. Após a ruptura dos eritrócitos, merozoítos são liberados na circulação sanguínea, invadem novos eritrócitos, dando continuidade ao ciclo e à doença. Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos masculinos e femininos. O ciclo sexuado tem início quando os gametócitos são aspirados pelo mosquito *Anopheles* no momento da picada. No estômago do mosquito os gametas sofrem maturação e o gameta masculino fecunda o gameta feminino gerando um zigoto. Este se diferencia em oocineto, uma forma móvel, que se aloja na parede intestinal do mosquito, e, em seguida, se diferencia em oocisto. Os oocistos, por esporogonia, geram esporozoítos que migram para as glândulas salivares do mosquito, de onde invadem um novo hospedeiro no momento da picada.

Fonte: Adaptado de MÉNARD, 2005.

Em determinadas espécies de plasmódios, entre estas o *Plasmodium vivax*, algumas formas do parasita presentes nos hepatócitos ficam dormentes, sob uma forma conhecida como hipnozoíta, e a infecção pode reaparecer, mesmo se

aparentemente curada, muitos anos depois. As recaídas nas infecções por *P. vivax* correspondem a este fator, a ciclos pré-eritrocíticos e eritrocíticos tardios, devido a hipnozoítas que permaneceram quiescentes no fígado durante determinado período de tempo (REY, 2001).

Os plasmódios se desenvolvem dentro do vacúolo parasitóforo, onde se alimentam de hemoglobina, passando por vários estágios. O primeiro estágio é chamado de trofozoíta jovem ou anel que, após ter seu citoplasma aumentado, evoluem para trofozoítas maduros prontos para a multiplicação. Estes, primeiro pela divisão dos núcleos, se transformarão em esquizontes através de um processo de divisão celular denominado esquizogonia; em seguida, pela citodierese, dão origem aos merozoítas nos esquizontes maduros também denominados rosáceas. Após a ruptura dos eritrócitos os novos merozoítos são liberados na circulação sanguínea e invadem novas hemácias, dando continuidade ao ciclo e à doença. No entanto, alguns parasitas não iniciam o processo de divisão celular e se diferenciam nas formas sexuadas, os gametócitos masculinos e femininos. Quando ingeridos pelo mosquito no momento do repasto sanguíneo alcançam o trato digestivo do inseto, onde as hemácias são digeridas e os gametócitos são liberados (JONES, M.K. & GOOD, 2006).

Ciclo Sexuado no mosquito

O ciclo sexuado tem início quando as formas sexuadas (macrogametócitos e microgametócitos) do plasmódio são aspiradas pelo mosquito *Anopheles* quando este pica a pele humana (**Figura 1**). No estômago do mosquito os gametócitos sofrem maturação, o microgameta se forma por exflagelação, fecunda o macrogameta, e gera um zigoto. Este diferencia-se em oocineto, uma forma móvel,

que atravessa a parede do estômago e se aloja na membrana basal, diferenciando-se em oocisto. Este desenvolve-se e divide-se em milhares de esporozoítos, em um processo denominado esporogonia. Após a ruptura do oocisto os esporozoítos são liberados e migram para as glândulas salivares do inseto, de onde invadem um novo hospedeiro humano no momento da picada (MÉNARD, 2005).

1.5 – A Malária no Brasil e no mundo

A malária é ainda hoje uma das mais importantes endemias mundiais. Considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal doença infecciosa causada por protozoário que acomete a humanidade há séculos, causando atualmente cerca de 250 milhões de novos casos e, aproximadamente, um milhão de mortes por ano em todo o mundo. Os parasitas estão presentes em todas as áreas tropicais e a doença é endêmica em toda a África sub-sahariana, sudeste da Ásia, Indonésia e ilhas da Oceania com exceção da Nova Zelândia, e nas Américas Central e do Sul. A situação da malária é especialmente mais preocupante na África, onde uma em cada cinco mortes infantis (20%) está relacionada aos efeitos da doença (WHO, 2009).

No Brasil, nos dias atuais, aproximadamente 95% dos casos registrados ocorrem na Amazônia Legal (COURA *et al.*, 2006). O número de casos registrados no Brasil nos últimos anos teve uma variação significativa, em 1999 foram 610.000, reduzindo para aproximadamente 350.000 em 2002 e recrudescendo a partir de 2003 quando foram registrados aproximadamente 400.000 casos. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005). Em 2009, no período entre janeiro e agosto, 282.088 casos foram

registrados na região amazônica. Deste total, 79,2% dos casos se concentraram nos estados do Amazonas, Pará e Rondônia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

A malária no Brasil é causada por *P. falciparum*, *P. vivax* e, mais raramente por *P. malariae*. Atualmente, o *P. vivax* é responsável por cerca de 80% do número de casos, enquanto o *P. falciparum* é responsável por menos de 20% destes, porém, pelo maior número de casos graves e mortais. Existe elevada perda econômica em virtude dos dias em que os doentes deixam de trabalhar, bem como a malária causa prejuízo também na exploração do potencial turístico da região (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

1.6 - Quimioterapia da Malária

A grande complexidade do ciclo de vida do parasita explica as enormes dificuldades que têm surgido, ao longo dos tempos, para o estabelecimento de uma terapia antimalárica eficaz e segura. Por atuarem em diferentes fases do ciclo do parasita, os antimaláricos podem ser classificados como esquizotocidas, hipnozoitocidas, gametocitocidas ou esporontocidas (NUNES & FERREIRA, 2005).

Na atualidade os fármacos antimaláricos expandem-se em um grande número de moléculas orgânicas que são normalmente distribuídas em três famílias: (a) os compostos aril aminoálcoois, que incluem os alcalóides da quina (*Chinchona sp.*) como a quinina, todas as aminoquinolinas sintéticas e as acridinas; (b) o grupo constituído pelos antifolatos, como a pirimetamina e a trimetoprima, pelos antibióticos com atividades antimaláricas, como os biguanidas e as sulfonamidas e outros como as naftoquinonas; (c) o grupo constituído pelos derivados artemisínicos que englobam a artemisinina e seus derivados (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002; FRANÇA *et al.*, 2008).

Antes da chegada dos europeus ao continente americano, os índios peruanos já utilizavam a casca da quina (*Chinchona*) para o tratamento da malária. Em 1639, missionários jesuítas levaram consigo algumas cascas desta planta para a Europa, e lá elas se tornaram a terapêutica principal para o tratamento da malária. Todavia, foi somente em 1820 que os químicos franceses Pelletier e Caventou isolaram a substância ativa da casca da quina, o alcalóide quinina (VALE *et al.*, 2005).

A quinina faz parte da família das quinolinas (**Figura 2**) que incluem as 4-aminoquinolinas (cloroquina e amodiaquina), as 8-aminoquinolinas (pamaquina e primaquina) e os álcoois quinolínicos (mefloquina, halofantrina e quinina). Estes compostos são ativos contra formas eritrocíticas de *P. falciparum* e *P. vivax*. A quinina (**Figura 2**) é reservada ao tratamento da malária falciparum sensível a esse fármaco, sendo usualmente utilizada em conjunto com um segundo fármaco, como a doxiciclina ou a tetraciclina, em áreas onde ocorre resistência. O principal efeito colateral produzido pela quinina é o *chinchonismo*, caracterizado por zumbido e tonturas, que pode ser intenso o suficiente para diminuir a adesão ao tratamento. Além deste, são outros efeitos adversos relacionados à quinina, a hipoglicemia (por estímulo à liberação de insulina pelo pâncreas) e a hipotensão arterial (NUNES & FERREIRA, 2005).

O mais eficaz dentre esta família de fármacos foi a cloroquina (**Figura 2**), uma das substâncias antimaláricas mais utilizadas para o tratamento e profilaxia da malária em muitas regiões endêmicas. Foi sintetizada primeiramente na Alemanha, todavia, não foi reconhecida como um antimalárico potente até 1940, período a partir do qual teve a sua eficácia validada por militares americanos (FRANÇA *et al.*, 2008). Por conseguinte, a cloroquina foi o fármaco de escolha utilizado na campanha de

erradicação da malária promovida no período de 1950 a 1960, até o surgimento da resistência do parasita. Ela atua como um agente esquizonticida e raramente produz efeitos colaterais graves no tratamento profilático da doença (GREGSON & PLOWE, 2005).

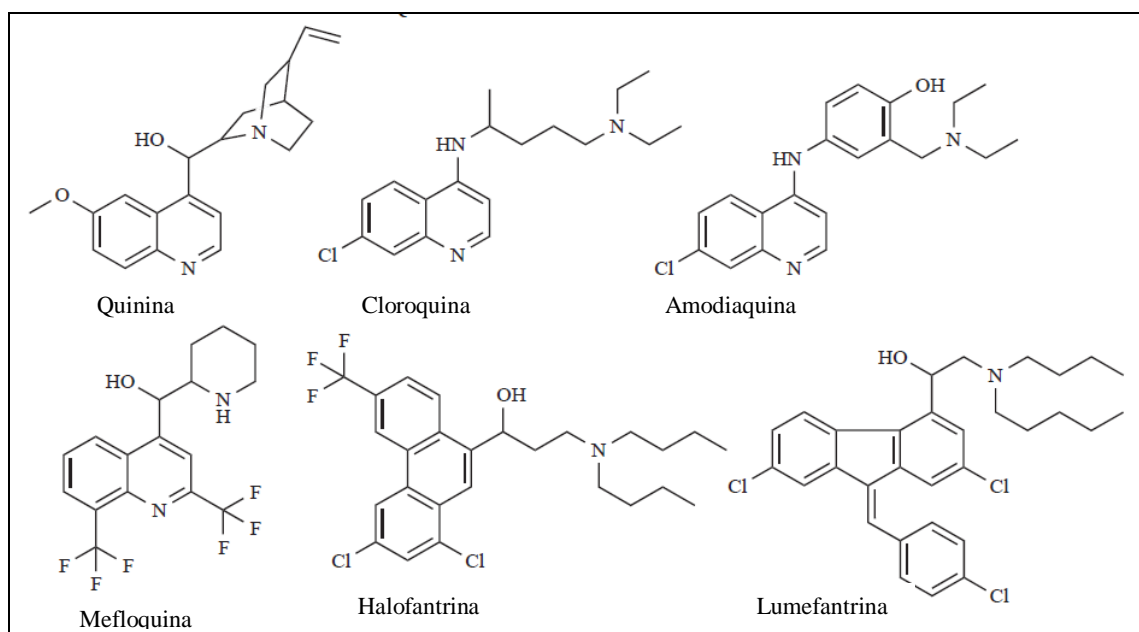


Figura 2. Estruturas dos álcoois quinolínicos: Quinina, Mefloquina, Halofantrina e Lumefantrina, e das 4 aminoquinolinas: Cloroquina e Amodiaquina.
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2007.

A mefloquina (**Figura 2**) tem ação esquizonticida para *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae*, e ação gametocida para *P. vivax*. Os efeitos colaterais mais comuns, geralmente leves, incluem náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal; manifestações neuropsiquiátricas e arritmias cardíacas podem ocorrer mais raramente. A mefloquina é contra-indicada em pessoas com antecedente de doença neurológica ou psiquiátrica, pacientes com arritmias cardíacas e profissionais que necessitem de boa coordenação espacial (NUNES & FERREIRA, 2005).

A amodiaquina (**Figura 2**) surgiu em 1945 e, comparativamente à cloroquina, se apresenta mais ativa contra *P. falciparum* e menos tóxica para os pacientes. Foi largamente utilizada ao longo de quarenta anos, até ter sido associada a efeitos graves de agranulocitose e hepatotoxicidade, em 1986 (KRISHNA & WHITE, 1996).

Nos anos 60, o *Walter Reed Army Institute of Research* (WRAIR) desenvolveu um novo antimalárico denominado halofantrina, um fenantrenometanol (**Figura 2**), efetivo contra a malária resistente à cloroquina. Este fármaco apresenta distúrbios gastrintestinais como principal efeito colateral (VALE *et al.*, 2005).

A lumefantrina (**Figura 2**) foi inicialmente sintetizada na Academia Militar das Ciências Médicas de Beijing, na China, na década de 80. Até o momento, não existem dados clínicos da sua eficácia como monoterápico, todavia, tem sido relatada a sua eficácia em combinação com o arteméter (*ibid.*).

As 8-aminoquinolinas constituem a única classe de fármacos gametocidas, além da eficácia contra formas teciduais primárias e secundárias do parasita. A primaquina e a pamaquina (**Figura 3**) são dois exemplos. A pamaquina, sintetizada na Alemanha durante a década de 20, é o mais antigo agente antimalárico do grupo das 8-aminoquinolinas (FRANÇA *et al.*, 2008), enquanto a primaquina foi sintetizada nos Estados Unidos da América em 1946, e tem sido amplamente utilizada contra hipnozoítos (formas exoeritrocitárias) em *P. vivax* e *P. ovale* (VALE *et al.*, 2005).

A primaquina é o mais utilizado dos fármacos desse grupo, sendo geralmente co-administrada com um agente esquizonticida sanguíneo, como a cloroquina, a amodiaquina ou a pirimetamina (FRANÇA *et al.*, 2008).

Uma vez que a primaquina apresenta de atividade contra os gametócitos de todas as espécies do plasmódio que causam a malária humana, destaca-se por ser

o único antimalárico bloqueador da transmissão da doença (BOLCHOZ *et al.*, 2001). Todavia, a primaquina é tóxica para pacientes com deficiência em glicose-6-fosfato (G6PD) eritrocitária, condição que provoca anemia hemolítica e confere maior resistência ao parasita (BAIRD & RIECKMANN, 2003). Por esta razão a primaquina é formalmente contra-indicada para o tratamento de gestantes, sob o risco de causar hemólise no feto (NUNES & FERREIRA, 2005).

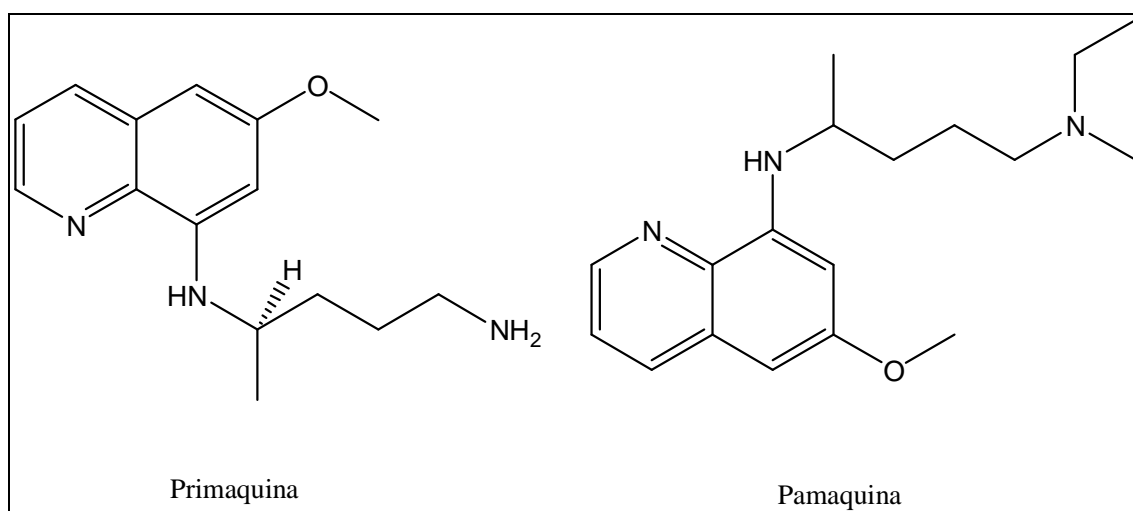


Figura 3. Estruturas da Primaquina e da Pamaquina
Fonte: Adaptado de VALE *et al.*, 2005.

O mecanismo de ação das quinolinas ainda não está completamente elucidado. Existem evidências de que a interação entre os antimaláricos esquizonticidas sanguíneos com o grupo heme ou ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX) está envolvida na toxicidade destes fármacos ao parasita intraeritrocítico. Vários experimentos *in vitro* estabeleceram que fármacos antimaláricos quinolínicos agem na cristalização da hemozoína, inibindo a formação da mesma (SULLIVAN *et al.*, 1998).

Os parasitas degradam cerca de 75% da hemoglobina dos eritrócitos e a utilizam como fonte alimentar. A hemoglobina é importada para dentro de um compartimento ácido do parasita, o vacúolo alimentar, e é degradada por enzimas proteolíticas, chamadas plasmecinas. O resíduo livre heme ou ferriprotoporfirina IX(Fe(III)PPIX) é tóxico ao parasita. A Fe(III)PPIX é polimerizada formando um composto inerte, insolúvel e não tóxico ao parasita, o pigmento malárico hemozoína (SILVA *et al.*, 2005). Nesta situação, o efeito primário dos fármacos antimaláricos que atuam na fase eritrocítica da doença é a ligação com a Fe(III)PPIX e a inibição da sua polimerização para formação da hemozoína. Secundariamente, a Fe(III)PPIX e o complexo Fe(III)PPIX-fármaco acumulam-se e ficam disponíveis para exercer seus efeitos tóxicos (ORJIH *et al.*, 1994).

A base precisa para os efeitos tóxicos da Fe(III)PPIX livre e seus complexos com antimaláricos quinolínicos no parasita não está completamente estabelecida. Uma das hipóteses é que esta toxicidade resulta da atividade peroxidativa da Fe(III)PPIX e dos complexos Fe(III)PPIX-fármaco sobre os lipídeos da membrana (SUGIOKA & SUZUKI, 1991). Outra hipótese é que a Fe(III)PPIX lisa o parasita via um mecanismo coloidosmótico, possivelmente pela inibição da manutenção do gradiente de cátions (EGAN & MARQUES, 1999).

O grupo constituído pelos antifolatos pode ser dividido em dois subgrupos de acordo com o mecanismo de ação. O primeiro grupo (antifolatos do tipo I) inclui compostos que são competidores do ácido *para*-aminobenzóico (PABA), interrompendo a formação do ácido di-hidrofólico, necessário para a síntese de ácidos nucleicos, através da inibição da di-hidropteroato sintase. São constituintes deste subgrupo as sulfonas e as sulfonamidas. A dapsona (**Figura 4**) é a sulfona antimalárica mais conhecida, porém, apresenta alta toxicidade, fato que justifica a

sua baixa utilização. As sulfonamidas antimaláricas são representadas pela sulfadoxina (**Figura 4**), a sulfadiazina e o sulfaleno. Os representantes desta família são de fácil absorção pelo organismo, porém apresentam difícil excreção (FRANÇA *et al.*, 2008).

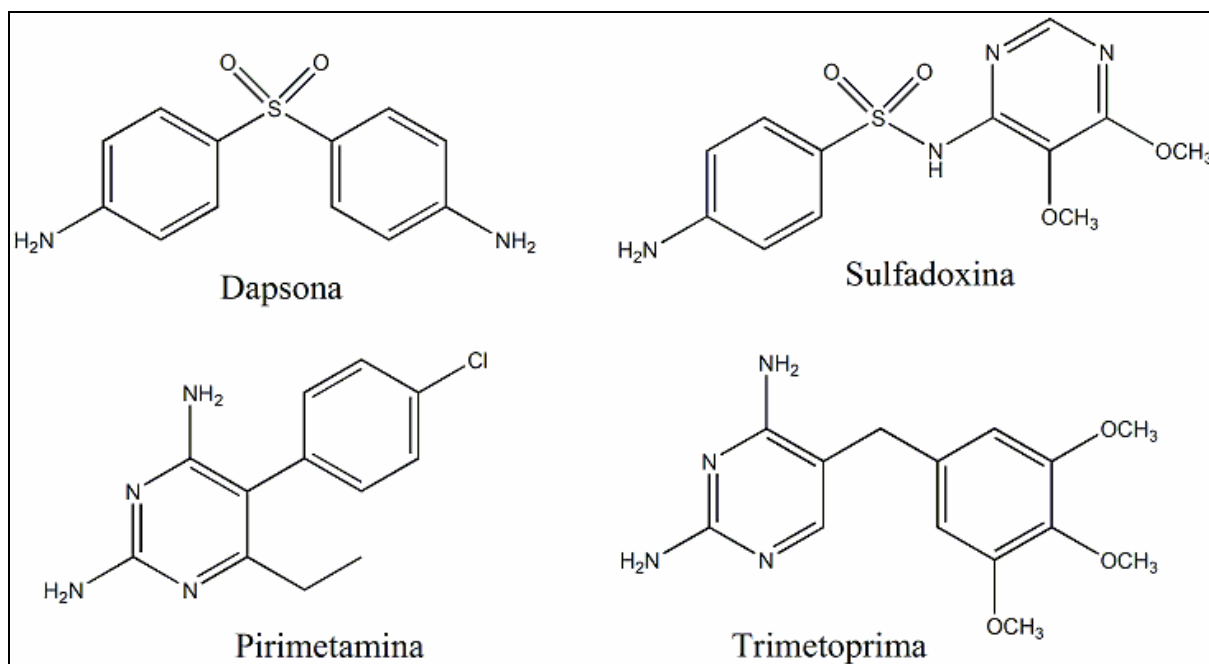


Figura 4. Estruturas dos antifolatos do tipo I, Dapsona e Sulfadoxina, e dos antifolatos do tipo II, Pirimetamina e Trimetoprima
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2007.

O segundo subgrupo de antagonistas do folato (antifolatos do tipo II) liga-se preferencialmente e seletivamente à enzima di-hidrofolato redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) do parasita. Esta inibição interfere na capacidade do *Plasmodium* em converter o ácido dihidrofólico em tetra-hidrofolato, cofator importante no processo de síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos. Esta enzima já teve sua estrutura determinada inicialmente de forma incompleta, por métodos de difração de raios- X

(YUVANIYAMA *et al.*, 2003), depois a estrutura foi completada por modelagem molecular por homologia (FRANÇA *et al.*, 2004) e tem sido alvo de diversos estudos por modelagem molecular visando o planejamento de novos antimaláricos (SIRAWARAPORN *et al.*, 1997; DELFINO *et al.*, 2002; FRANÇA *et al.*, 2004).

Inibidores da DHFR são potentes agentes esquizonticidas que atuam sobre formas assexuadas do parasita. São compostos deste subgrupo de antifolatos a pirimetamina e a trimetoprima (**Figura 4**).

Tanto a pirimetamina como a trimetoprima são fármacos de atuação lenta contra o *P. falciparum*, não sendo, portanto, indicados para o tratamento da fase aguda da malária. A combinação da pirimetamina com a sulfadoxina resultou em um fármaco denominado Fansidar®, patenteado pela Roche.

As biguanidas têm um mecanismo de ação semelhante ao da pirimetamina e da trimetoprima. O mais importante destes compostos, o proguanil (**Figura 5**) é um pró-fármaco que é metabolicamente ciclizado a cicloguanil (**Figura 5**).

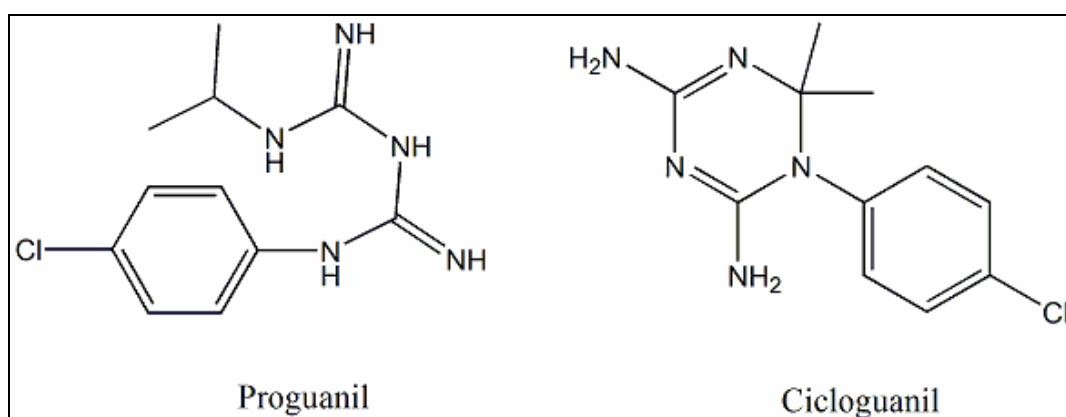


Figura 5. Estruturas do Proguanil e do Cicloguanil
Fonte: FRANÇA *et al.*, 2008.

Este composto é pouco tóxico e é útil como agente profilático, destruindo parasitas durante a passagem para a corrente sanguínea antes que invadam as hemácias (FRANÇA *et al.*, 2008).

A atovaquona (**Figura 6**) é uma hidroxi-naftoquinona cuja atividade anti-plasmódica baseia-se num mecanismo de ação particular, a inibição do sistema de transporte de elétrons mitocondriais do parasita, afetando, por consequência, a biossíntese de pirimidina (WILLIAMS & CLARK, 1998).

A atovaquona foi utilizada como antimalárico durante a Segunda Guerra Mundial, apresentando eficiência inferior à cloroquina. Posteriormente deixou de ser utilizada como monoterápico, passando a ser utilizada em combinação com outros fármacos.

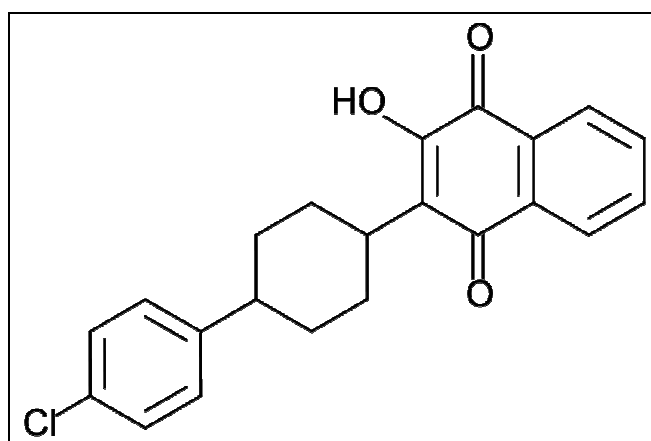


Figura 6. Estrutura da Atovaquona
Fonte: VALE *et al.*, 2005.

A artemisinina, ou *qinghaosu* é um produto natural extraído de uma erva medicinal chinesa a *Artemisia annua* ou *Qing Hao* como é conhecida pelos chineses. Consta que os chineses, desde o século II, já usavam com sucesso infusões da

planta *Artemisia* para a cura da malária (FRANÇA *et al.*, 2008). Porém, o fármaco dela derivado, a artemisinina, foi isolado pela primeira vez na década de 70. A partir da artemisinina, já foram sintetizados vários análogos com variadas atividades farmacocinéticas como o artesunato de sódio, a dihidroartemisinina, o arteéter e o arteméter (**Figura 7**).

Estes compostos sesquiterpênicos são esquizotocidas sanguíneos além de apresentar também atividade gametocida, o que limita a transmissão do plasmódio para outros hospedeiros, reduzindo assim a propagação de formas resistentes (VALE *et al.*, 2005).

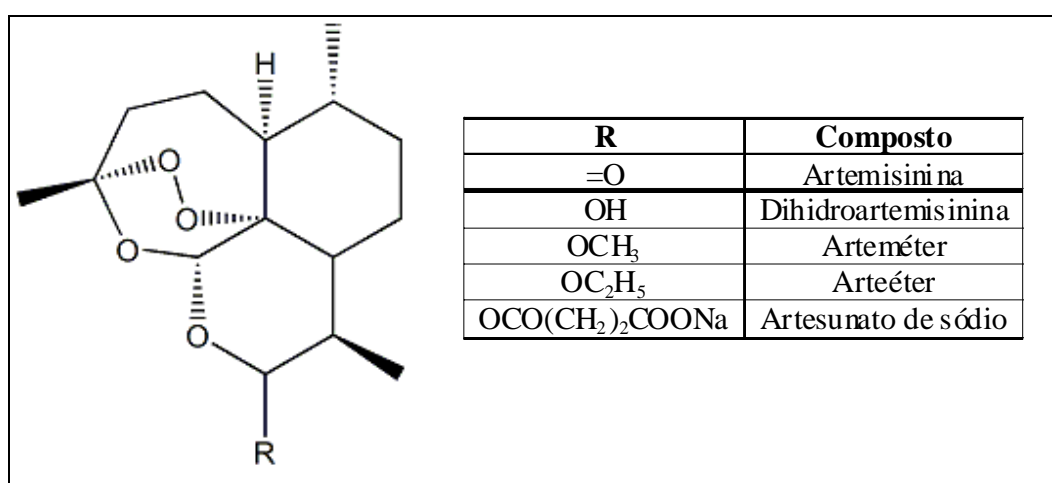


Figura 7. Estruturas da Artemisinina e seus derivados: Dihidroartemisinina, Arteméter, Arteéter e Artesunato de sódio
Fonte: FRANÇA *et al.*, 2008.

A artemisinina é o agente antimalárico de ação mais rápida, promovendo melhoras significativas do estado febril em apenas 32 horas, em contraste com os dois ou três dias que outros antimaláricos clássicos levam para provocar efeitos semelhantes (VALE *et al.*, 2005).

Os derivados artemisínicos, por sua vez, caracterizam-se pela rápida absorção oral e boa distribuição tecidual e têm despertado interesse na concepção de fórmulas terapêuticas combinadas, envolvendo outros antimaláricos de ação lenta e tempos de meia vida mais longos. Esta estratégia visa à redução da duração do tratamento e do desenvolvimento de resistência por parte do parasita. Uma destas formulações terapêuticas, por exemplo, combina o artesunato com a mefloquina e é recomendada como terapia padrão na Tailândia (WIESNER *et al.*, 2003).

Além disto, estas substâncias são ativas contra cepas de *Plasmodium* resistentes a todos os outros fármacos e têm aplicação crescente no tratamento de malária *falciparum* aguda, sobretudo no sudeste asiático. Apesar do sucesso dessa família de fármacos, já há relatos da ocorrência de resistência a esses compostos em algumas províncias da China (HYDE, 2002).

O mecanismo de ação dos fármacos artemisínicos tem sido atribuído à quebra da ligação peróxido por reação do fármaco com o Fe(II) do grupo heme, no vacúolo do parasita, gerando-se radicais que vão alquilar esse grupo (WIESNER *et al.*, 2003). Estudos mostram que a ponte de endoperóxido destes compostos pode ser clivada pela redução com o íon ferroso presente no grupo heme da hemoglobina ou de origem exógena. Esta clivagem forma um ou mais radicais livres que podem alquilar ou modificar covalentemente proteínas dos parasitas. Todavia, em estudo posterior pesquisadores refutam esta hipótese, defendem que a artemisinina não é ativada pelo ferro hêmico no parasita, e que não há a necessidade de formação de radicais para que o fármaco exerça a sua toxicidade sobre o *Plasmodium* (PARAPINI *et al.*, 2004).

Tem-se discutido recentemente a associação de fármacos altamente eficazes como estratégia para evitar o surgimento de resistência, em geral envolvendo um medicamento de meia-vida curta (por exemplo, o artesunato), e um de eliminação lenta (como a mefloquina, a cloroquina ou a amodiaquina). A combinação de fármacos para a terapia da malária pode ter efeitos complementares (por exemplo, contra as diferentes fases do parasita), efeitos aditivos contra a mesma fase do parasita, efeitos sinérgicos, ou qualquer uma destas combinações (GREGSON & PLOWE, 2005). Com base nessas premissas, a Organização Mundial da Saúde tem patrocinado ensaios clínicos em que antimaláricos convencionais e de baixo custo são associados ao artesunato e ao arteméter (NUNES & FERREIRA, 2005). Além disso, novos fármacos efetivos contra todos os estágios, combinados ou não com artesunato, vêm sendo testados na África e na Ásia. São exemplos destas combinações que atualmente estão disponíveis para uso clínico:

- Atovaquona-proguanil (Malarone®) - a atovaquona é uma naftoquinona que atua na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, enquanto o proguanil bloqueia a síntese do ácido fólico. Sua associação tem efeito sinérgico; o proguanil potencializa a ação da atovaquona. Em estudos randomizados no Gabão e no Brasil, essa combinação mostrou uma taxa de cura de 87% e 98,7%, respectivamente, em infecções não complicadas por *P. falciparum*. Todavia, existe uma séria restrição ao seu uso referente ao alto custo deste medicamento (RADLOFF *et al*, 1996 *apud* NUNES & FERREIRA, 2005).
- Arteméter-lumefantrina (Riamet®, Coartem®) - o arteméter é um derivado da artemisinina, enquanto que a lumefantrina, um arilaminoálcool, pertence à mesma classe da halofantrina. Em estudos randomizados, observaram-se

taxas de cura entre 87% e 97% para malária falciparum não-complicada (VAN AGTMAEL *et al*, 1999).

- Artesunato-mefloquina (Artequin 600/750®) - essa associação tem sido usada na Tailândia. Seu uso pode resultar na diminuição da transmissão de *P. falciparum* e na restauração da sensibilidade à mefloquina (BROCKMAN *et al.*, 2000).
- Clorproguanil-dapsona (Lapdap®) - ambos os fármacos são antifolatos. Estudos clínicos no Quênia mostraram que existem duas características favoráveis a esta nova associação, ela é tão efetiva quanto à combinação sulfadoxina-pirimetamina, todavia, conta ainda com a vantagem de apresentar meia-vida mais curta, o que deverá retardar o desenvolvimento de resistência por parte do plasmódio (WATKINS *et al*, 1988).

1.7 – Resistência aos antimaláricos.

A resistência à quimioterapia é um dos maiores entraves no controle da malária. Ela se deve ao princípio da evolução das espécies, no qual a presença de fármacos, também conhecida como a “pressão dos fármacos”, funciona como processo de seleção natural dos parasitas resistentes no interior do hospedeiro (HASTINGS & DONNELLY, 2005). A grande capacidade de adaptação dos parasitas da malária revela-se na rapidez com que se desenvolveu, em particular em *P. falciparum*, resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940 (SILVA & OLIVEIRA, 2002). Mutações em diferentes genes são o principal mecanismo capaz de produzir resistência dos plasmódios aos

antimaláricos. Em decorrência deste fato, o tratamento inadequado das infecções seleciona eficazmente as mutações que conferem resistência (NUNES & FERREIRA, 2005).

Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento e a disseminação de resistência do Plasmodio aos fármacos, entre os quais se destacam: a interação de padrões de utilização do fármaco, como a dosagem; as características intrínsecas do medicamento, como a meia-vida; fatores relacionados ao hospedeiro, como o sistema imunológico; características do parasita, como a presença de mutações genéticas; fatores relacionados ao vetor, como a afinidade deste pelo parasita; e fatores relacionados ao meio ambiente, como as regiões endêmicas (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

A suscetibilidade do *P. falciparum* aos quimioterápicos antimaláricos é comumente avaliada pela resposta terapêutica (teste *in vivo*), como também por ensaios de sensibilidade intrínseca do *P. falciparum* realizados *in vitro*, através da medida da inibição do crescimento do parasita, ou da maturação do esquizonte, na presença do fármaco (BLOLAND, 2001). A Organização Mundial da Saúde definiu originalmente que a resposta *in vivo* aos medicamentos, correspondente à sensibilidade do plasmódio ao fármaco utilizado, seria avaliada nos termos do clareamento da parasitemia, o que gerou a classificação das cepas de plasmódio em cepas sensíveis (S) e cepas resistentes (R), estas últimas sendo subdivididas em três graus de resistência, RI, RII e RIII (WHO, 2001).

Acredita-se que a primeira ocorrência de cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina ocorreu no final dos anos 50, no Sudeste Asiático e também na América do Sul (WHO, 2001). Atualmente, cepas com esta característica estão espalhadas por todas as áreas endêmicas do mundo excetuando-se a América

Central e o Caribe (WERNSDORFER & PAYNE, 1991; WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

Atualmente, a resistência clínica à monoterapia do quinino ocorre esporadicamente no sudeste da Ásia e na Oceania ocidental. Resultados de estudos *in vitro* indicam que a resistência é menos frequente na América do Sul (ZALIS *et al.*, 1998) e na África (JELINEK *et al.*, 2001). Para as duas últimas décadas, o quinino tem sido constantemente utilizado em combinação com um parceiro antibiótico como a tetraciclina ou doxiciclina para aumentar a eficácia do tratamento. O quinino é atualmente reconhecido como um fármaco de segunda ou de terceira linha, utilizado em casos de malária grave (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

A resistência à sulfadoxina-pirimetamina foi notificada pela primeira vez na fronteira entre Tailândia e Camboja, em meados da década de 1960 (BJORKMAN, 1990). Atualmente, alto nível de resistência a este fármaco é encontrada em grande parte do sudeste da Ásia, no sul da China, em grande parte do continente Africano e no Brasil (WHO, 2001; VASCONCELOS, 2000), enquanto que graus mais baixos e frequências menores de resistência são observados na costa do Pacífico da América do Sul, no sul da Ásia, no leste do Irã, e na Oceania ocidental (BLOLAND, 2001).

A resistência à mefloquina também foi observada pela primeira vez na fronteira da Tailândia com o Camboja no final da década de 80 (SHANKS, 1994). O advento da resistência à mefloquina na Tailândia pode ter sido influenciado pelo uso intensivo do quinino (fármaco quimicamente relacionado) justamente pouco tempo antes da introdução da mefloquina (WERNSDORFER, 1994).

As artemisininas não são utilizadas isoladamente para o tratamento clínico, são normalmente combinadas com antimaláricos de ação mais prolongada, como a mefloquina ou a lumefantrina. De uma forma geral, doses adequadas dos esquemas

terapêuticos de combinações de artemisina e mefloquina, ou arteméter e lumefantrina, não têm apresentado falhas no tratamento devido à resistência à artemisinina (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

No Brasil há relatos de resistência a praticamente todos os fármacos adotados como de primeira linha para o tratamento da malária não-complicada (NUNES & FERREIRA, 2005). A combinação sulfadoxina-pirimetamina deixou de ser usada no território brasileiro no início da década de 90, devido ao surgimento de resistência. Atualmente, todos os isolados de *P. falciparum* da Amazônia brasileira apresentam mutações que conferem resistência à cloroquina (VIEIRA *et al.*, 2004). Quanto aos demais fármacos, há relatos de diminuição de sensibilidade ao quinino e falha terapêutica tardia com artesunato em isolados brasileiros de *P. falciparum* (ZALIS *et al.*, 1998).

Várias mutações têm sido descritas em isolados resistentes aos antimaláricos. Uma mutação no códon 76 do gene *pfcr1*, que codifica uma proteína de transporte da membrana do vacúolo digestivo do parasita, é fortemente associada com a resistência à cloroquina (FIDOCK *et al.*, 2000). Além deste gene, experimentos de transfecção demonstraram que polimorfismos do gene *pfmdr1* apresentam possibilidade de associação a diversos graus de resistência à cloroquina e modulam também a susceptibilidade à mefloquina e aos compostos estruturalmente relacionados, quinino e halonfantrina (REED *et al.*, 2000). Mais recentemente, estudos moleculares realizados com cepas de *P. falciparum* oriundas da África, Ásia e América do Sul revelaram que cepas com haplótipos mutantes do gene *pfcr1* não apenas apresentavam resistência à cloroquina, bem como exibiam também maior suscetibilidade à artemisinina e ao quinino (SIDHU *et al.*, 2002).

A resistência à sulfadoxina/pirimetamina (Fansidar®) surge pela presença de mutações pontuais nas regiões codificantes do centro ativo da enzima bifuncional DHFR- TS, para a pirimetamina, e da enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), para a sulfadoxina (KUBLIN *et al.*, 2002; COWMAN *et al.*, 1988). Para a pirimetamina, geralmente a mutação no gene *dhfr* no códon 108, que corresponde à alteração de uma serina para uma asparagina, parece ser suficiente para conferir resistência a este medicamento e conseqüentemente à sulfadoxina/pirimetamina (PETERSON *et al.*, 1991). Este fato explica a razão pela qual a resistência do parasita tenha surgido imediatamente após a generalização do uso deste fármaco como terapêutica da malária (FERNANDES, 2007). Além disto, mutações nos códons 51 e 59 encontram-se normalmente implicadas nos elevados níveis de resistência a este fármaco (KUBLIN, *et al.*, 2002). Estudos realizados demonstraram que para o gene *dhps*, mutações pontuais nos códons 436, 437, 540 e 613, estão associadas a resistência à sulfadoxina (PETERSON *et al.*, 1988). Outros estudos demonstraram também que o conjunto de três mutações no gene *dhfr* (códons 51, 59 e 108) e duas no gene *dhps* (códons 437 e 540), designado *quíntuplo mutante*, é considerado como um marcador molecular para a falha terapêutica, observado no tratamento de *Plasmodium falciparum* com sulfadoxina/pirimetamina (PLOWE *et al.*, 1997).

A multirresistência aos fármacos de *P falciparum* foi definida como sendo a resistência a mais de dois compostos antimaláricos operacionais de classes químicas diferentes (WERNSDORFER, 1994). Ela ocorre principalmente no sudeste da Ásia, particularmente nas regiões fronteiriças da Tailândia. Desde 1995 o alto nível de resistência à mefloquina levou à substituição desta monoterapia pela combinação de artesunato e altas doses de mefloquina para os casos confirmados,

por microscopia, de malária falciparum em áreas da Tailândia reconhecidamente multirresistentes (WONGSRICHANALAI *et al.*, 2002).

Além da Tailândia, algumas áreas da região Amazônica Brasileira também se encontram na categoria de áreas multirresistentes. Estas áreas têm apresentado relatos esporádicos de resistência à mefloquina e reduzida suscetibilidade ao quinino. A terapia da combinação artesunato-mefloquina está sendo adotada como regime de primeira linha, na fronteira entre Peru e Brasil (*ibid.*).

A falta de uma vacina profilática efetiva, associada à disseminação de cepas resistentes e multirresistentes aos fármacos em uso indicam claramente a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e identificação de novos alvos para a prevenção e terapêutica da Malária (TASDEMIR, 2006).

1.8 - Apicoplasto

O Filo Apicomplexa é composto por organismos unicelulares e intracelulares obrigatórios de grande importância médica e veterinária. Neste Filo encontram-se os patógenos humanos do gênero *Plasmodium*, o agente etiológico da malária, o *Toxoplasma gondii*, agente causal da toxoplasmose, bem como patógenos que causam doenças em criações de animais para o consumo humano, como *Babesia spp*, *Theileria spp* e *Eimeria spp*.

A grande maioria dos representantes deste grupo apresenta um plastídeo não-fotossintético, delimitado por quatro membranas, contendo genoma próprio, o apicoplasto, que dá nome ao Filo. A origem provável do apicoplasto foi o processo de endossimbiose realizado pelo apicomplexo com uma célula procariótica semelhante à cianobactéria (WILSON, 1995). A existência de quatro membranas no

apicoplasto é indicativo de ter havido dois eventos endossimbióticos no decorrer do processo evolutivo dos apicomplexos. O primeiro evento endossimbiótico gerou um plastídeo caracterizado por duas membranas, semelhante ao das algas e vegetais. Este plastídeo, posteriormente, teria sofrido transferência lateral em várias linhagens eucarióticas, por um processo denominado endossimbiose secundária, no qual o endossimbionte que continha o plastídeo sofre agora fagocitose por outro eucarionte. Desta forma o plastídeo secundário que surge apresenta quatro membranas (McFADDEN & ROOS, 1999).

Embora o apicoplasto contenha um genoma circular pequeno, a maioria do proteoma desta organela é codificada no genoma nuclear do protozoário, e as proteínas são subsequentemente transportadas para o apicoplasto, por apresentarem na extremidade N-terminal uma sequência sinal, semelhante ao sinal clássico de secreção encontrado em peptídeos, que as direciona para o sistema de endomembranas do plastídeo (RALPH *et al.*, 2004).

O apicoplasto é reconhecido como essencial para a viabilidade dos parasitas de longo prazo, fato coerente com a sua conservação durante a evolução dos apicomplexos. Suas funções de manutenção, tais como, replicação de DNA, transcrição, processamento e tradução de RNA, são alvos estabelecidos para a intervenção médica, seja diagnóstica, ou terapêutica (GORNICKI, 2003). Além disto, a finalização da sequência genômica do *P. falciparum* (GARDNER *et al.*, 2002), juntamente com a disponibilidade dos bancos genômicos de *Plasmodium* (PlasmoDB, PATS e PlasmoAP), revelaram a existência de genes com produtos destinados ao plastídeo que constituem vias metabólicas típicas de plantas, tais como: a via de biossíntese de ácidos graxos Tipo II (FAS II), a via metil-eritrol fosfato (MEP) para a

biossíntese de isoprenóides e a via de biossíntese de heme (WILSON, 2005; RALPH *et al.*, 2004).

1.9- Via metabólica de biossíntese dos ácidos graxos em *Plasmodium*

Até pouco tempo acreditava-se que as espécies de *Plasmodium* haviam perdido a via metabólica de síntese *de novo* de ácidos graxos (VIAL & ANCELIN, 1992). Este dogma começou a mudar com a descoberta e caracterização de inúmeras enzimas participantes da síntese de ácidos graxos em *P. falciparum* (WALLER *et al.*, 1998), e demonstração da incorporação de acetato em ácidos graxos de *P. falciparum* (SUROLIA & SUROLIA, 2001).

A biossíntese de ácidos graxos é fundamental para o desenvolvimento do plasmódio. Além dos ácidos graxos constituírem os principais componentes das membranas celulares, são uma importante fonte de energia, desempenham um papel fundamental na transdução de sinal, na acilação de proteínas, bem como são necessários para o crescimento, diferenciação e homeostase do *P. falciparum* (TASDEMIR, 2006). Também é sabido que a biossíntese de lipídios aumenta muito durante as fases eritrocitárias, nas quais o parasita cresce e se divide extremamente rápido (*ibid.*). Quando o parasita invade seu hospedeiro, ele tenta se proteger, induzindo a formação de um vacúolo chamado vacúolo parasitóforo, que desempenha uma função protetora ao sistema imunológico do hospedeiro (VIAL *et al.*, 2003). Neste processo, o parasita necessita produzir seus próprios ácidos graxos *de novo*, de modo a formar e expandir a sua membrana celular (SINNIS & SIM, 1997).

O mecanismo biossintético dos ácidos graxos, denominado sistema FAS (*Fatty Acid Synthase*), envolve ciclos repetitivos de condensação, ceto-redução,

desidratação e enoil-redução (ANDRADE *et al.*, 2008). Os fungos, mamíferos e algumas micobactérias realizam a síntese de ácidos graxos através da ação de proteínas multifuncionais, sendo cada reação catalisada por uma região distinta (domínio) desta proteína única, multifuncional. Essas enzimas são classificadas como ácido graxo sintases do Tipo I, e também são descritas como ácido graxo sintases do tipo “associadas”, pois etapas sucessivas na reação de síntese de ácidos graxos ocorrem em domínios específicos (ROCK & CRONAN, 1996; SUROLIA & SUROLIA, 2001). De outra forma, as plantas e muitas bactérias utilizam as enzimas ácido graxo sintases do Tipo II ou "dissociadas". Neste caso, cada etapa do sistema de biossíntese de ácidos graxos do Tipo II (FAS II) é catalisada por uma enzima específica codificada por um determinado gene. Estas enzimas foram melhor caracterizadas em *E. coli* (WEEKS & WAKIL, 1968). Uma vez que o sistema FAS II é ausente em humanos, representa uma grande oportunidade para aplicações terapêuticas.

A primeira enzima envolvida no sistema FAS II é a acetil-CoA carboxilase (ACC), uma proteína que carboxila acetil-CoA para produzir malonil-CoA, que é então transferido para a proteína transportadora de acil (ACP) pela enzima transacilase ACP (FabD) (**Figura 8**). A biossíntese de ácidos graxos, propriamente dita, é iniciada pela condensação de malonil-ACP e acetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetoacil ACP sintase III (FabH). Logo após, inicia-se a série cíclica de alongamento, que é repetida até que determinado ácido graxo saturado seja produzido. A primeira etapa do ciclo é a redução NADPH-dependente de β -cetoacil-ACP a β -hidroxilacil-ACP, catalisada pela enzima β -cetoacil-ACP redutase (FabG). Em seguida, uma molécula de água é removida pela β -hidroxilacil-ACP desidratase/isomerase (FabA) e/ou pela β -hidroxilacil-ACP desidratase (FabZ) para

formar *trans*-2-enoil-ACP. O passo final no processo de alongamento é a redução, NADH-dependente, da ligação dupla, formando acil-ACP. É um passo fundamental do processo, catalisado pela enzima *2-trans*-enoil-ACP redutase (FabI ou ENR). Ciclos subsequentes são iniciados pela condensação de malonil-ACP com acil-ACP, formando β -cetoacil-ACP com dois carbonos adicionais. Esta reação é catalisada pela β -cetoacil-ACP sintase I (FabB), ou pela β -cetoacil-ACP sintase II (FabF).

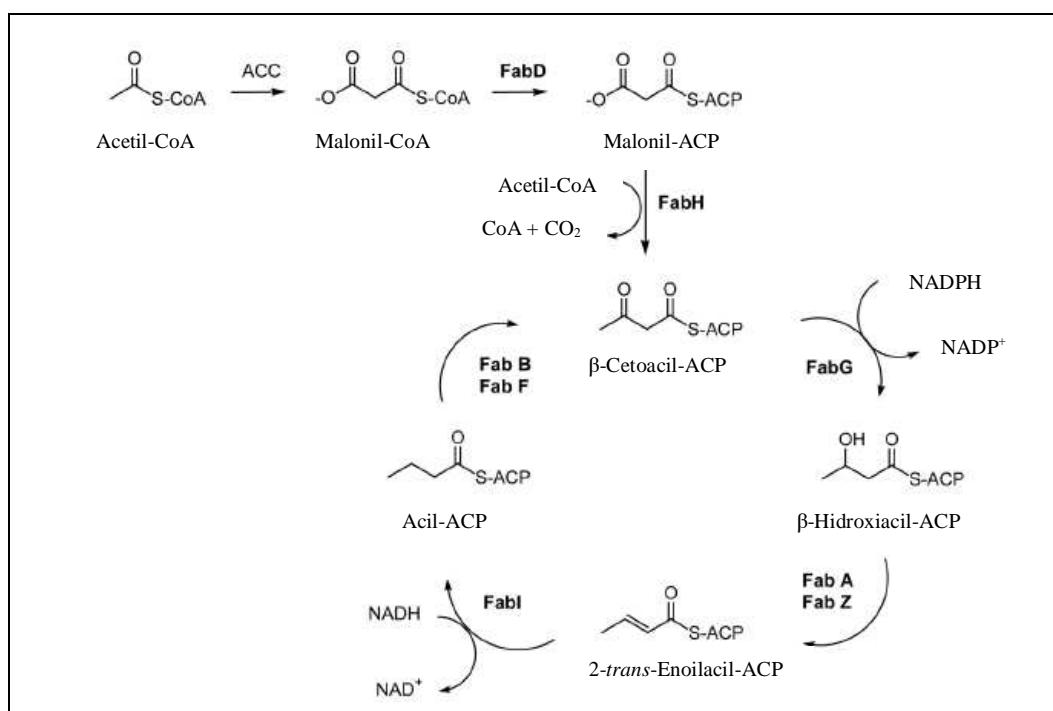


Figura 8. Biossíntese de ácidos graxos do Tipo II (FAS II) e as enzimas integrantes do processo. ACC: acetil-CoA carboxilase, ACP: proteína transportadora de acila, FabD: ACP transacilase, FabH: β -cetoacil-ACP sintase III, FabG: β -cetoacil-ACP redutase, FabA: β -hidroxidecanoil-ACP desidratase /isomerase, Fabz: β -hidroxi-ACP desidratase, FabI: enoil-ACP redutase, FabB: β -cetoacil-ACP sintase I, FabF: β -cetoacil-ACP sintase II
Fonte: Adaptado de CARBALLEIRA, 2008.

Os ciclos continuam até que um determinado comprimento de cadeia de ácido graxo seja alcançado (HEATH *et al.*, 2001). Em *Plasmodium*, ciclos sucessivos de alongamento levam à formação dos ácidos decanóico (C-10), láurico (C-12) e

mirístico (C-14), como os principais produtos do processo de síntese de ácidos graxos (VIAL *et al.* 2003), enquanto que o ácido palmítico (C-16) é o ácido graxo mais predominantemente sintetizado em seres humanos (TASDEMIR, 2006).

A biossíntese de ácidos graxos tem despertado atenção especial como alvo atraente no desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos, antifúngicos e antimaláricos. São exemplos de inibidores conhecidos que têm sido apresentados como agentes antimicrobianos em razão de inibir a biossíntese de ácidos graxos: isoniazida (inibe a FabI), tiolactomicina e seus derivados (inibe FabB e FabH), ceruleína (inibe FabI) e triclosan (inibe a FabI), entre outros inibidores reportados na literatura (GORNICKI, 2003; CARBALLEIRA, 2008).

1.10 – 2-*trans* enoil-ACP redutase (ENR, E.C. 1.3.1.9)

A enzima 2-*trans* enoil-ACP redutase (ENR) merece destaque, pois catalisa a reação principal do processo de biossíntese dos ácidos graxos (**Figura 9**) e regula o ciclo de alongamento dos mesmos (HEATH *et al.*, 2001).

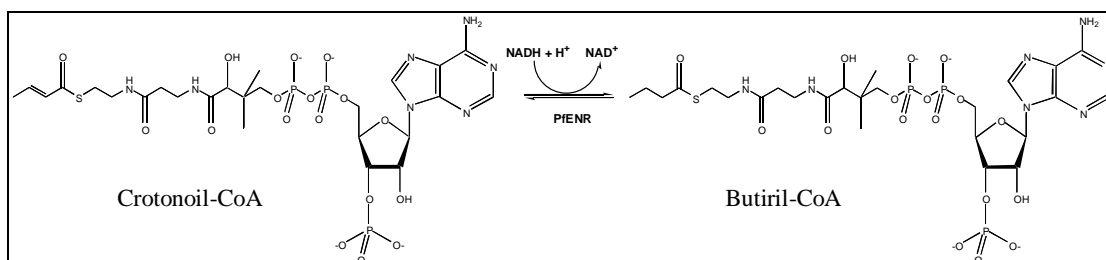


Figura 9. Reação catalisada pela PfENR: Redução, NADH-dependente, da ligação dupla do Crotonoil-CoA, formando Butiril-CoA
Fonte: Medeiros *et al.*, 2011

Vários inibidores da atividade da ENR do *P. falciparum* (PfENR) já foram descritos na literatura, entre os quais destacam-se: ceruleína, um antibiótico produzido por fungos, inibidor não competitivo de PfENR, com IC₅₀ variando entre 10 a 20 µM (SUROLIA & SUROLIA, 2001; WALLER *et al.*, 2003); Genz-10850 e Genz-8575, dois análogos da piperazina, selecionados por triagem virtual com IC₅₀ variando entre 10 a 50 µM (KUO *et al.*, 2003); triclosan, um bisfenol clorado que atua formando um complexo ternário com a enzima e o NAD⁺ e inibe o crescimento *in vitro* de *Plasmodium falciparum* com valor de IC₅₀ < 10 µM; (McLEOD *et al.*, 2001; SUROLIA & SUROLIA, 2001)

Dentre os inibidores de PfENR mencionados destaca-se o triclosan, que tem demonstrado ainda poucos efeitos secundários, sendo amplamente usado em produtos comerciais, como sabões, sabonetes, cremes dentais entre outros, pelo que se considera ser eficaz e não tóxico (HEATH *et al.*, 2001). O triclosan, de modo contrário a outros antibióticos, forma um complexo não-covalente com o NAD⁺ e a PfENR, via ligação hidrogênio (PEROZZO *et al.*, 2002).

A ENR de *Mycobacterium tuberculosis* (conhecida também por MtnhA) foi inicialmente identificada como sendo o alvo principal da isoniazida (INH; **Figura 10**), o medicamento mais utilizado para tratar a tuberculose ativa (BANERJEE *et al.*, 1994). A enzima é uma enoil-ACP redutase dependente de NADH, específica para substratos enoil tioéster de cadeia longa. A MtnhA é uma enzima do sistema FAS II micobacteriano que alonga acil ácidos graxos precursores dos ácidos micólicos.

A isoniazida é um pró-fármaco que é ativado pela enzima micobacteriana catalase-peroxidase (KatG) na presença de íons de manganês, NAD(H) e oxigênio (JOHNSSON & SCHULTZ, 1994; JOHNSSON *et al.*; 1995). Aproximadamente cerca

de 50% dos isolados clínicos INH-resistentes de *M. tuberculosis* apresentam deleções ou mutações no gene *katG* (HEYM *et al.*, 1995; RAMASWAMY *et al.*, 2003).

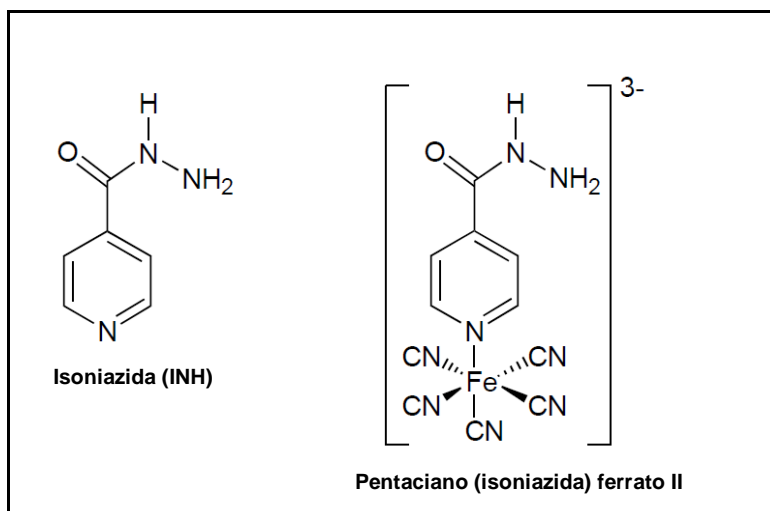


Figura 10. Estrutura química da isoniazida e do pentaciano (isoniazida) ferrato II
Fonte: adaptado de OLIVEIRA *et al.*, 2006.

O mecanismo de ação da INH requer a sua conversão, pela KatG micobacteriana, em vários intermediários eletrofílicos (JOHNSON & SCHULTZ, 1994). Em seguida, ocorre a formação do aduto através da adição de um ânion isonicotínico-acil ao NAD⁺, ou de um radical isonicotínico-acil a um radical livre NAD⁺ (ROZWARSKI *et al.*, 1998), conforme ilustrado na **Figura 11**.

O aduto isonicotinil-NAD⁺ foi caracterizado espectroscopicamente, e, desta forma, demonstrou-se que o mesmo liga-se à Mtnha com uma constante de dissociação de valor menor do que 0,4 nM (LEI *et al.*, 2000). Posteriormente, foi mostrado que este aduto constitui um inibidor competitivo lento que se liga fortemente à Mtnha selvagem. A ligação inicial, rápida e reversível ($K_i = 16$ nM), é seguida de lenta isomerização, formando um complexo enzima-inibidor mais forte,

com um valor da constante de dissociação global (K_i^*) de aproximadamente 0,75 nM (RAWAT *et al.*, 2003).

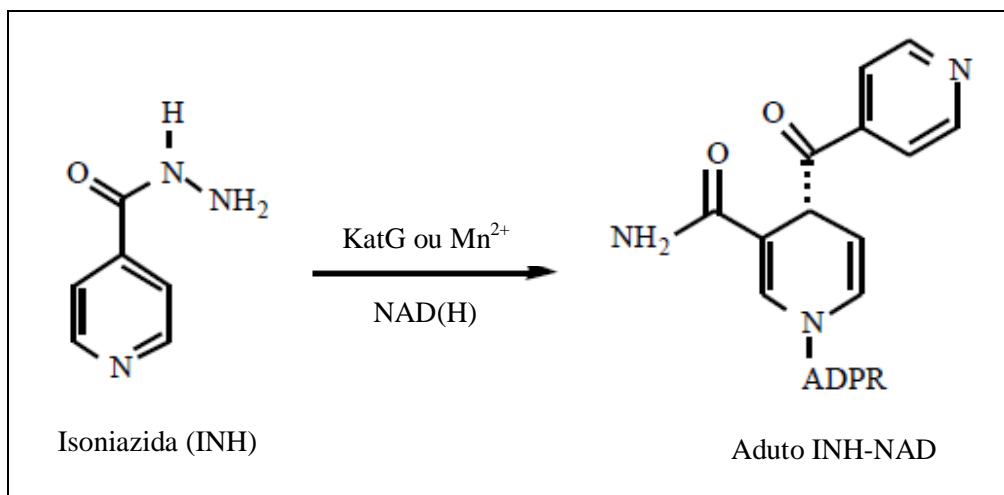


Figura 11. Estrutura química da isoniazida e do aduto INH-NAD que inibe a atividade enzimática de MtnhA
Fonte: OLIVEIRA *et al.*, 2006.

A atividade peroxidase da KatG catalisa a conversão de Mn^{2+} para Mn^{3+} (MAGLIOZZO & MARCINKEVICIENE, 1997). Experimentos de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica de congelamento rápido têm demonstrado que as abstrações dos átomos de hidrogênio podem ser iniciadas por um radical tirosil KatG (CHOUCHANE, *et al.*, 2002). Além disso, foi demonstrado que o rendimento do aduto isonicotinil- NAD^+ é aproximadamente o mesmo após a oxidação da INH por KatG ou Mn^{3+} (WILMING & JOHNSON, 1999). Desta forma, a oxidação por pirofosfato- Mn^{3+} tem sido proposta como um método alternativo para a ativação do INH não enzimática para a síntese química simples de vários derivados INH que imitam o aduto isonicotinil- NAD^+ (NGUYEN *et al.*, 2001).

Com base no mecanismo de ativação proposto para a INH, por intermédio de uma reação de transferência de elétrons (DeBARBER *et al.*, 2000), uma rota alternativa de autoativação tem sido proposta para o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento da tuberculose resistente e sensível à INH (BASSO, *et al.*, 2005). Estes fármacos seriam ativados por reações de transferência de elétrons antes de interagir com o seu alvo celular. A maior parte da resistência à INH está associada com alterações no gene estrutural *katG* que resultam em enzimas catalase-peroxidase mutantes com capacidade alterada para formação dos intermediários ativados de INH (ROSSETTI *et al.*, 2002). A rota alternativa, em contraposição à situação de resistência relacionada à KatG, está baseada na síntese de novas moléculas capazes de promover uma reação de transferência eletrônica esfera-interna (SOUZA *et al.*, 2005). Neste contexto, o uso de um complexo metálico redox-reversível em conjunto com o pré-fármaco aparece como um sistema primário (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

1.11 – Complexo Pentaciano (isoniazida) ferrato II

Recentemente foi demonstrado que o complexo pentaciano (isoniazida) ferrato II (**Figura 10**) inibe a atividade enzimática de ambos os tipos, selvagem e mutante I21V (INH-resistente), da enzima MtnhA (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Os resultados dos experimentos de cinética de inativação *in vitro* indicaram que este processo não requer ativação por KatG, não necessita da presença de NADH, e é também eficaz contra a MtnhA mutante INH-resistente. Foi determinado o valor da concentração inibitória mínima (MIC) de 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para este complexo inorgânico pelo sistema radiométrico BACTEC AFB para a cepa H37Rv de *M. tuberculosis*,

enquanto que ensaios de toxicidade realizados em células leucêmicas HL60, e em células de câncer de mama MCS-7 produziram um valor de $IC_{50} > 25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicando assim um bom índice de seletividade ($SI = IC_{50}/MIC > 125$); o *Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility of USA* sugere que para um composto avançar através de programas de triagem, o SI deve ser maior que 10 (BASSO *et al.*, 2005).

Posteriormente, foi comprovado que o complexo pentaciano (isoniazida) ferrato II é um inibidor de ação lenta da atividade enzimática da MtlhA, apresentando um valor real da constante de dissociação global de 70 nM (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Neste mecanismo de ação, um complexo enzima-inibidor inicial é rapidamente formado, e em seguida, sofre uma lenta reação de isomerização para um complexo binário enzima-inibidor, no qual o inibidor é mais fortemente ligado à enzima. A situação frágil no uso de inibidores enzimáticos clássicos como fármacos para condições clínicas é que a inibição resulta na acumulação do substrato da enzima, fato que pode ser superior à inibição. Em contrapartida, a acumulação de substrato pode não ter efeito algum sobre a isomerização do complexo inibidor-enzima típica do mecanismo de início lento, e desta forma, não favorecer a reversão da inibição (MORRISON & WALSH, 1988).

A comparação realizada com as estruturas terciárias das proteínas ENR de *P. falciparum*, *B. napus*, *E. coli* e *M. tuberculosis*, mostrou que todas as quatro estruturas são muito similares, ocorrendo, todavia, pequenas diferenças referentes ao tamanho e posicionamento do *loop* de ligação do substrato (PEROZZO *et al.*, 2004). A MtlhA apresenta este *loop* em uma conformação mais aberta do que a PfENR. Isto se dá, segundo os autores do trabalho, provavelmente, pela

necessidade de acomodar neste sítio a ligação dos ácidos graxos de cadeia longa (C16-C56), precursores dos ácidos micólicos (ibid.).

Por considerar: a importância vital da via de biossíntese FAS II para o *Plasmodium*; o entendimento de que a enzima ENR, por catalisar a reação principal desta via, é alvo validado para pesquisa de novos medicamentos antimicrobianos; a semelhança estrutural existente entre as enzimas PfENR e MtlNhA, bem como os resultados anteriores de inibição da atividade de MtlNhA pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II, de modo independente de ativação pela peroxidase KatG, nos propomos a verificar a ação deste complexo inorgânico contra a enzima PfENR.

2. OBJETIVOS

Geral:

Determinar os parâmetros cinéticos verdadeiros da enzima recombinante 2-*trans*-enoil-ACP-redutase de *Plasmodium falciparum* (PfENR) e realizar ensaios de inibição desta enzima pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II.

Específicos:

- Expressar e purificar a PfENR recombinante fusionada a uma cauda de histidina;
- Definir os parâmetros cinéticos verdadeiros da PfENR;
- Realizar estudos *in vitro* sobre o mecanismo cinético da PfENR;
- Realizar estudos inibitórios da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II;
- Determinar a constante de inibição (K_i) para o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Análise por Bioinformática

O gene da proteína 2-*trans*-enoil-ACP-redutase da cepa 3D7 de *P. falciparum* está identificado no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com os seguintes códigos de acesso: XM_961044 e XP_966137.1, enquanto no banco genômico específico para Plasmodio, o *Plasmodb* (<http://plasmodb.org/plasmo/>), está cadastrada com o código PFF0730c.

O gene da PfENR contem 1.299 pb, está localizado no cromossomo 6, e codifica uma proteína com 432 aminoácidos, massa molecular de 49,76 kDa e ponto isoelétrico teórico de 9,11. No banco de dados de proteína (<http://www.pdb.org/>) existem várias estruturas da PfENR depositadas, o código de acesso da estrutura utilizada neste trabalho foi 2O2Y.

Com o intuito de realizar um alinhamento da estrutura primária da PfENR com sequências homólogas, e posteriormente comparar a estrutura primária da PfENR com a estrutura primária da MtINHA, foram utilizadas as ferramentas de bioinformática Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/homologene/63285>) e ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.2- Amplificação do gene da PfENR e clonagem em vetor de expressão

A primeira estratégia de trabalho adotada neste estudo foi a via tradicionalmente utilizada em biologia molecular: a amplificação do gene selvagem da PfENR à partir do DNA genômico do *P. falciparum*; com posterior clonagem do gene de interesse em vetor de expressão. Todavia, esta estratégia não obteve êxito,

provavelmente, por não ter sido planejada inicialmente nenhuma otimização do gene da PfENR visando assegurar a expressão deste em sistema procarioto, a exemplo do que vinha sendo realizado por outros pesquisadores (KAPOOR *et al.*, 2001; PEROZZO *et al.*, 2002).

O *P. falciparum* tem um genoma muito rico em A-T, o que representa cerca de 80% do seu genoma e torna a expressão heteróloga de genes de *Plasmodium* em *E. coli* algo mais complicado de se conseguir, quando comparados a outros organismos (BACA & HOL, 2000). Outra grande dificuldade existente na superexpressão de genes de *P. falciparum* em *E. coli* é a presença, nesta última, de códons raramente utilizados por procariotos (*codon bias*), o que pode dificultar ou inibir totalmente a expressão da proteína recombinante de Plasmódio (CINQUIM *et al.*, 2001)

Por conseguinte, em decorrência das dificuldades de expressão encontradas, decidiu-se abortar esta estratégia inicial de trabalho e optar pela aquisição comercial da proteína purificada, oriunda da expressão de gene sintético e otimizado da PfENR, produzido por uma empresa de biotecnologia, como segunda alternativa de trabalho.

3.3- Aquisição comercial da proteína PfENR

A proteína *2-trans-enoil- ACP-redutase* de *Plasmodium falciparum* (PfENR) utilizada no presente trabalho foi expressa, purificada e obtida comercialmente da empresa GenScript Corporation New Jersey, EUA (lotes de números 66474S1/P105904 e 94657801/P10011006). Juntamente com a proteína acima citada foi obtido também da mesma empresa o plasmídeo pGS21a (**Figura**

12), contendo como inserto o gene da PfENR, fusionado a uma sequência de tiorredoxina (Trx), na região N-terminal, e à uma cauda de histidina. A fusão da PfENR à tiorredoxina justifica-se como estratégia para melhorar o nível de expressão desta proteína.

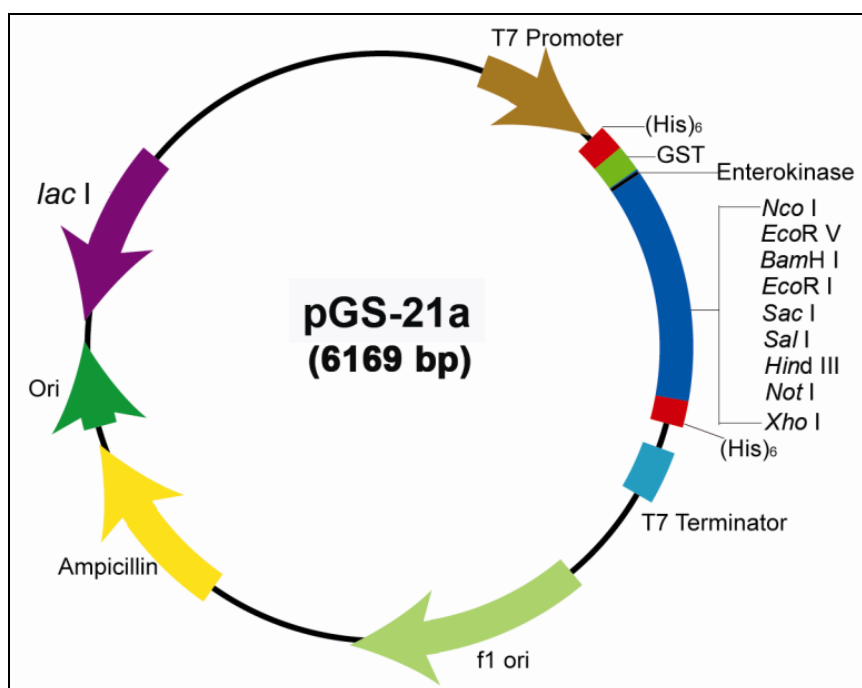


Figura 12. Mapa do vetor de expressão pGS-21a
Fonte: Genscript Corporation (cat. No. SD0121).

O vetor pGS-21a possui 6.169 pb e foi projetado para clonagem, expressão em alto nível e purificação de proteínas em fusão com ambos 6xHis e GST. (GenScript Corporation - Cat. N°. SD0121). O gene de interesse clonado neste vetor encontra-se sob regulação do promotor T7 do fago *Lambda*. O inserto da PfENR neste vetor foi flanqueado por sequências específicas das enzimas de restrição *NcoI* e *SalI*.

A sequência de aminoácidos da proteína PfENR sintética produzida pela empresa Genscript foi comparada, através do programa *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), à sequência original da proteína PfENR da cepa 3D7 de *P. falciparum* depositada no Gene Bank (XM_961044) e no PlasmoDB (PFF0730c), como se observa na **Figura. 13**.

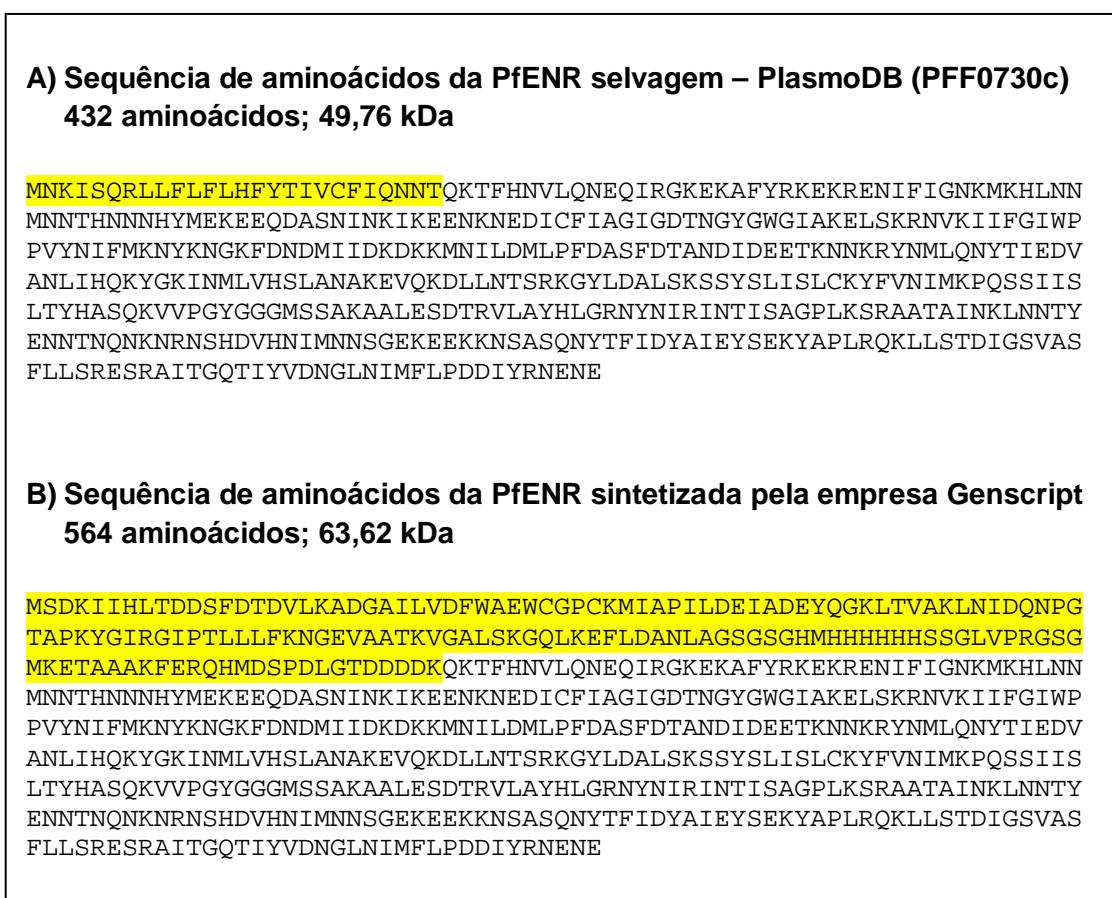


Figura 13. Sequência de aminoácidos das proteínas PfENR selvagem (A) e PfENR sintetizada pela empresa GenScript Corporation (B). Em destaque amarelo, a região de não-homologia entre as duas sequências
Fonte: NCBI (<www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A PfENR sintética, obtida da empresa GenScript Corporation, utilizada neste estudo, foi constituída para expressar 564 aminoácidos, tem peso molecular de

63,62 kDa enquanto a PfENR selvagem, da cepa 3D7, contem 432 aminoácidos e 49,76 kDa de peso molecular. Esta última apresenta 100% de identidade com os últimos 406 aminoácidos da sequência da PfENR sintética (**Figura. 13**), os outros 158 aminoácidos iniciais da proteína sintética constituem um cassete que apresenta homologia com uma proteína tiorredoxina, utilizada como ferramenta para melhorar os níveis de expressão da proteína recombinante.

Segundo o relatório da empresa GenScript Corporation, a proteína PfENR foi expressa em vetor pGS-21a, purificada através de uma única etapa em coluna de níquel, o que resultou em uma proteína com mais de 85% de pureza (**Figura 14**).

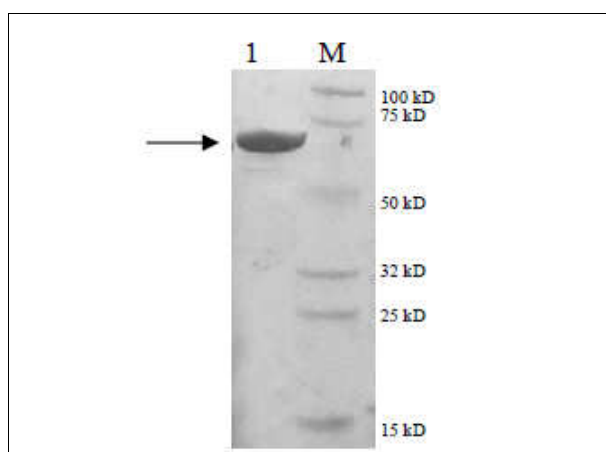


Figura 14: Análise em SDS-PAGE da pureza da proteína de fusão 2-*trans*-enoil-ACP-redutase após a purificação em coluna de níquel. Coluna 1: proteína de fusão 2-*trans* enoil-ACP-redutase; Coluna M: marcador de peso molecular (Genscript: Cat. No. MM0900)
Fonte: Relatório de produção da empresa GenScript Corporation (Project#94657-1).

3.3.1 - Testes de expressão da PfENR clonada em pGS-21a

Os testes de expressão da proteína de fusão PfENR, bem como a subsequente purificação da mesma, foram realizados no Centro de Pesquisas em

Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS), sob a orientação da Dra. Cláudia Paiva Nunes

Foram realizados vários testes de expressão com as cepas de *E. coli*: BL21(DE3) pLysS e BL21 Codon plus RIL. As cepas de *E. coli* foram transformadas, por eletroporação, com o plasmídeo recombinante pGS-21a contendo o gene da PfENR. A eletroporação foi realizada a um pulso de 2,45 kV com capacitância de 25 μ F e resistência de 200 ohms (cubeta de 0,2 mm) em aparelho BioRad.

Por conseguinte, as células transformantes foram selecionadas em meio LB sólido contendo o antibiótico ampicilina (50 μ g/mL). Um pré-inóculo (1:50) das células transformantes foi adicionado a 50 mL de meio de cultura LB, contendo a mesma concentração do antibiótico utilizado no meio LB sólido. As células foram crescidas a 37°C, sob agitação de 180 rpm até alcançarem uma OD₆₀₀ de 0,4 – 0,6. Em seguida, as culturas foram induzidas com a adição de 0,5 mM de isopropil β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e incubadas em duas temperaturas distintas, 30°C e 37°C, além de uma terceira estratégia, a aplicação de um choque térmico (40°C por 30 minutos) na cultura que crescia a 37°C. Como controle, foram utilizadas culturas sem a indução com IPTG. Alíquotas de 1,0 mL de cada cultura foram coletadas, nos seguintes períodos de tempo: 4, 8, 12 e 24 horas. Em seguida as alíquotas das culturas foram centrifugadas a 12.000 g, por 3 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os sedimentos estocados a -20°C para posterior análise.

3.3.2 - Lise Celular

Para a observação dos resultados dos testes de expressão, as amostras das culturas bacterianas foram ressuspendidas em 500 – 700 μ L de tampão Tris-HCl (50

mM, (pH 7,8- 8,0) e depois submetidas ao processo de lise celular por ultrassom (2 pulsos de 10 segundos com 1 minuto de intervalo e 21% de amplitude). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 30 minutos, a 14.000 rpm. As frações solúvel e insolúvel das amostras foram separadas, diluídas 4x em tampão de proteína e desnaturadas a 100°C por 10 minutos, período após o qual foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, para reconhecimento da expressão da proteína alvo. No gel foram aplicados 10 uL das amostras.

3.3.3- Purificação da proteína PfENR expressa em pGS-21a

Para a etapa de purificação, bactérias *E. coli* BL21 (DE3) plysS foram crescidas em 1,0 L de meio TB (*Terrific Broth*) a 37°C. Após alcançarem uma OD₆₀₀ de 0,4, as células cresceram por mais 12 horas, na ausência de indução por IPTG. Após este período o meio de cultura foi centrifugado a 18.000 rpm, a 4°C, por 30 minutos. As amostras foram pesadas e aliqüotadas em porções de 2,0 g. Para cada grama de sedimento gerado, adicionou-se 5,0 mL do seguinte tampão: Hepes 50 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 20 mM, pH 8,5. A esta solução foi adicionado o inibidor de protease *Complete EDTA-free da Roche* (nº. cat. 1873580), segundo o protocolo do fabricante. As amostras de sedimento ficaram em contato com esta solução, sob agitação, por 30 minutos, a 4°C. Em seguida foram submetidas ao processo de lise celular por ultrassom (10 pulsos de 10 segundos com 1 minuto de intervalo e 60% de amplitude). Por conseguinte as amostras foram novamente centrifugadas a 18.000 rpm, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi utilizado na purificação.

Utilizou-se a cromatografia de afinidade por metal imobilizado (Ni^{+2}) como primeira etapa da purificação da proteína recombinante PfENR com resíduos de histidina. O sobrenadante obtido no processo de lise celular foi aplicado na coluna HisTrap HP da GE Healthcare. Como tampão de lavagem foi utilizado: Hepes 50 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 20 mM, pH 8,5.; e como tampão de eluição: Hepes 50 mM + NaCl 300 mM + Imidazol 250 mM, pH 8,5.

Os testes de purificação foram realizados utilizando o sistema de purificação de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ÄKTA (GE Healthcare) para o controle do fluxo, pressão da coluna cromatográfica, detecção de vários comprimentos de onda, pH, temperatura, controle de gradiente, aplicação e coleta de amostras.

Após a primeira etapa de purificação em coluna de níquel, as amostras foram diluídas 10X em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,7 e aplicadas em resina de troca aniônica Mono Q (HR 10/10 da Pharmacia Biotech). A resina foi lavada com Tris-HCl 50 mM + NaCl 1M, pH 8,7. Ao término do processo de purificação, 10 μL das amostras foram diluídos em 2,5 μL do tampão de corrida e incubadas a 100°C por 10 minutos. Em seguida, o volume total das amostras (12,5 μL) foi aplicado em gel de poliacrilamida, para se observar o grau de pureza da PfENR.

As amostras obtidas nesta etapa foram submetidas ao processo de diálise para retirar o sal da solução. A diálise foi realizada em 1,0 L de solução tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5, na qual a amostra ficou sob agitação, à temperatura de 5°C , por duas horas, período após o qual se fez a troca do tampão, num total de 2 substituições.

3.3.4- Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração da proteína PfENR, expressa no vetor pGS21a, foi realizada pelo método de Bradford *et al.* (1976), usando o kit para ensaio protéico *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) e albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

3.3.5- Avaliação da atividade enzimática da PfENR

O ensaio de atividade enzimática da PfENR purificada neste estudo foi realizado seguindo a metodologia adotada por Surolia *et al.* (2001), utilizando como substrato Crotonoil-CoA e NADH ($\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). O ensaio foi realizado a 25°C, com a seguinte mistura de reação: tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5; NADH 50 μM , Crotonoil-CoA 40 μM e 2 - 50 μL da enzima purificada. A taxa de atividade enzimática foi medida pela variação da absorbância a 340 nm por minuto.

3.4- Velocidade inicial e determinação de parâmetros cinéticos

Os ensaios de determinação dos parâmetros cinéticos e de inibição da PfENR, apresentados no presente trabalho, foram realizados com a PfENR (E.C.1.3.1.9) expressa e purificada pela empresa GenScript Corporation, New Jersey, USA (lote n°. 66474S1/P105904).

Todos os experimentos foram realizados no Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF) da PUC/RS, sob a orientação de bancada do Dr. Rodrigo G. Ducati e orientação geral do Dr. Luiz Augusto Basso.

Os reagentes químicos utilizados nos ensaios cinéticos, Crotonoil-CoA (lote n°. 23209029) e NADH (lote n°. 038K5166), foram obtidos da empresa Sigma. Todos

os ensaios de atividade no estado estacionário foram realizados em um espectrofotômetro UV-visível, modelo UV-2550, da Shimadzu.

Foram realizados ensaios de atividade enzimática, em espectrofotômetro, com a enzima PfENR e seus substratos naturais (Crotonoil-CoA e NADH) para a determinação da velocidade inicial e dos parâmetros cinéticos verdadeiros no estado estacionário, quais sejam: constante de Michaelis-Menten (K_M), velocidade máxima ($V_{máx}$) e constante catalítica (k_{cat}). Os ensaios enzimáticos foram realizados sob a temperatura de 25°C, através do monitoramento da redução da absorbância, a 340 nm, devido ao consumo de NADH ($\epsilon_{340} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Para realizar tais aferições foi utilizada uma mistura de reação constituída por tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5, PfENR purificada 0,12 μM , na presença de concentrações diversas de Crotonoil-CoA (10-240 μM) e várias concentrações fixas de NADH (20-220 μM), em um volume total de reação de 500 μL . Foram realizadas medidas em duplicata ou triplicata para cada dado individual produzido no experimento de velocidade inicial.

3.5 – Equilíbrio de ligação dos ligantes NADH e Butiril-CoA à PfENR

A titulação fluorimétrica, ou ensaio de ligação, foi realizada com o intuito de estudar a interação de equilíbrio entre a enzima PfENR e seus substratos ou produtos a 25°C, objetivando o entendimento sobre o mecanismo da reação catalisada por esta enzima. Os experimentos de fluorimetria foram realizados em um espectrofotômetro RF-5301PC da Shimadzu. A enzima e o seu substrato, ou produto, foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5, em seguida foram sendo adicionados volumes do substrato (ou produto) e foram tomadas 3 medidas fluorimétricas do ensaio, após cada adição do reagente. Para cada

reagente submetido a este experimento foi realizado um ensaio de referência (*Inner filter*), no qual se observava a existência de variação no perfil de emissão de energia radiante do reagente isoladamente, na medida em que se aumentava a concentração deste na solução tampão, na ausência da enzima.

A titulação fluorimétrica com o substrato NADH foi realizada através de acréscimos de 1 a 2 microlitros de uma solução de NADH nas concentrações 0,5 mM, 1,0 mM e 5,0 mM (0,50- 119,21 μM de concentração final de NADH) a 1,0 mL de PfENR 3,0 μM , mantendo a diluição para um máximo de 4,1%. Para as medidas de mudanças na fluorescência da proteína PfENR ao ligar-se ao NADH, foi empregado o comprimento de onda de excitação em 360 nm e o comprimento de onda de emissão variou de 360- 560 nm (máximo PfENR $\lambda_{\text{EM}} = 460$ nm); enquanto os *slits* dos comprimentos de onda de excitação e de emissão foram, respectivamente, 1,5 e 5 nm.

Na titulação fluorimétrica com o substrato Crotonoil-CoA foram acrescentados microlitros (1, 2, 4, 10, 20 ou 50) de uma solução de Crotonoil-CoA 0,5 mM e 5,0 mM (0,50- 425,97 μM de concentração final de Crotonoil-CoA) a 1,0 mL de PfENR 3,0 μM , mantendo a diluição para um máximo de 10,1%. Para as medidas de mudanças na fluorescência intrínseca da proteína PfENR ao ligar-se ao Crotonoil-CoA, foi empregado o comprimento de onda de excitação em 305 nm e o comprimento de onda de emissão variou de 325- 370 nm (máximo PfENR $\lambda_{\text{EM}} = 348$ nm); enquanto os *slits* dos comprimentos de onda de excitação e de emissão foram, respectivamente, 15 e 5 nm.

No ensaio de ligação com o produto Butiril-CoA foi feita a adição de microlitros (1, 2, 4 ou 5) de Butiril-CoA nas concentrações de 0,5 mM, 5 mM e 10mM (0,50- 550,85 de concentração final de Butiril-CoA) a 1,0 mL de PfENR 3,0 μM ,

mantendo a diluição para um máximo de 8,4%. Para as medidas de mudanças na fluorescência da proteína PfENR ao ligar-se ao Butiril-CoA, foi empregado o comprimento de onda de excitação em 300 nm e o comprimento de onda de emissão variou de 320- 400 nm (máximo PfENR $\lambda_{EM} = 337$ nm); enquanto os parâmetros dos comprimentos de onda de excitação e de emissão foram, respectivamente, 5 e 10 nm.

Experimentos controles foram realizados tanto para determinar a concentração máxima de ligante a ser utilizada sem qualquer variação intrínseca no perfil de emissão, quanto para monitorar o efeito da diluição na fluorescência da proteína. Não se realizou a titulação fluorimétrica com o produto NAD^+ , pois este reagente apresentou variação intrínseca no perfil de emissão de energia radiante no ensaio de referência (*Inner filter*), na ausência da enzima.

3.6 – Cinética da PfENR no estado pré-estacionário

Foram realizadas aferições cinéticas no estado pré-estacionário da conversão $NADH \rightarrow NAD^+$, catalisada pela PfENR, para confirmar o mecanismo cinético proposto e avaliar se a constante de velocidade aparente para esta conversão contribui para o passo limitante da reação. O decréscimo na absorvância correspondente à conversão do NADH a NAD^+ foi monitorado em 340 nm (1 mm de largura do *slit* = 4,65 nm banda espectral), a 25 °C, utilizando uma base de tempo dividida (0.2-2 s, 200 pontos para cada tempo base). As condições experimentais foram PfENR 3,14 μM e NADH 200 μM em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5 (concentrações da câmara de mistura). O tempo perdido do equipamento de *stopped-flow* utilizado foi de 1,37 ms.

3.7- Atividade *in vitro* do composto pentaciano (isoniazida) ferrato II contra PfENR

O composto pentaciano (isoniazida) ferrato II utilizado neste trabalho foi sintetizado pelo Dr. Luiz G. F. Lopes e pelo Dr. Eduardo H. Souza do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE.

O ensaio de inibição tempo-dependente da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II foi conduzido da forma como foi realizado para MtlNhA (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A enzima foi pré-incubada com o inibidor por 15 minutos (enzima 2,77 μM :inibidor 2.455 μM), tempo após o qual a atividade enzimática foi monitorada pela adição de alíquotas de 0,12:54 μM da mistura enzima:inibidor, às misturas de reação contendo Crotonoil-CoA e NADH em concentrações próximas aos seus valores de K_M . As adições das alíquotas da mistura enzima:inibidor ocorreram com diferentes tempos de exposição e a reação foi monitorada pelo seguimento da atividade enzimática durante o curso do tempo.

3.8 – Cinética de inibição lenta da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II

Neste estudo, experimentos típicos de inibição por ligação lenta (*slow-onset inhibition*) foram realizados na presença de várias concentrações do composto pentaciano (isoniazida) ferrato II, na tentativa de elucidar o mecanismo cinético da inibição tempo-dependente observada para PfENR. No caso dos inibidores de ligação lenta, a ligação, que é composta pelo estabelecimento do equilíbrio entre a enzima, o inibidor e os complexos enzima-inibidor, ocorre lentamente, em uma escala de tempo que varia de segundos a minutos (MORRISON & WALSH, 1988).

Estes experimentos foram conduzidos sob condições em que as concentrações utilizadas do composto pentaciano (isoniazida) ferrato II foram significativamente maiores que a concentração da enzima, e as aferições foram feitas dentro de um intervalo de tempo durante o qual não houve degradação significativa do substrato. As misturas de reação continham: Crotonoil-CoA 80 μM , NADH 120 μM , glicerol 2%, BSA 49,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II 0-35 μM . As reações foram iniciadas pela adição da enzima (0,69 nM) à mistura de reação e foram monitoradas pelo acompanhamento do decréscimo da absorbância do NADH, a 340 nm, num período de 21.600 segundos (6 horas). A atividade da enzima, em baixa concentração neste ensaio, foi estabilizada pela adição de glicerol e BSA na mistura de reação, conforme descrito para MtlhA (RAWAT *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

3.9 – Mecanismo de inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II

O mecanismo de dois passos observado para a inibição da MtlhA pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II (OLIVEIRA *et al.*, 2006) foi investigado também para a PfENR. Esta foi pré-incubada na presença de várias concentrações do inibidor, enquanto o decréscimo de sua atividade foi acompanhado através da retirada de alíquotas da mistura de pré-incubação em intervalos apropriados, seguida por uma medição rápida da velocidade inicial.

As reações de inativação da PfENR tempo-dependentes foram realizadas em misturas de reação contendo PfENR 12 μM e várias concentrações do inibidor. Experimentos controle foram realizados na ausência do inibidor. Em tempos

diversos, a atividade residual da enzima foi determinada através da diluição (100 vezes) de uma alíquota da mistura de reação na solução de ensaio, que continha Crotonoil-CoA 40 μM e NADH 50 μM .

3.10 – Análise de Dados

Os valores dos parâmetros cinéticos e respectivos erros-padrão foram obtidos pelo ajuste dos dados às equações adequadas, utilizando a função de regressão não-linear do programa SigmaPlot 2004 (SPSS, Inc.).

Aparentemente, o conjunto de linhas paralelas obtidas como resultado dos experimentos de velocidade inicial ajustaram-se à equação (1), que descreve um mecanismo de deslocamento duplo (SMITH & SIMONS, 2005). Para a equação (1), v é a velocidade de reação medida, V é a velocidade máxima, A e B são as concentrações dos substratos (NADH e Crotonoil-CoA) e K_a e K_b são suas respectivas constantes de Michaelis.

$$v = \frac{VAB}{(K_aB + K_bA + AB)} \quad (1)$$

Dados provenientes da espectroscopia de fluorescência de equilíbrio foram ajustados tanto para uma função hiperbólica [equação (2) (MICHAELIS & MENTEN, 1913)], quanto para a equação de Hill [equação (3) (HILL, 1913)]. Para as equações (2) e (3), F é o sinal de fluorescência observada, $F_{\text{máx}}$ é a fluorescência máxima, a razão $F/F_{\text{máx}}$ representa o grau de saturação, A é a concentração do ligante (NADH ou Butiril-CoA), n representa o número total de sítios de ligação, K_d é a constante de

dissociação global, e K' representa a constante de dissociação média para a formação do complexo binário enzima: ligante, que é composta por fatores de interação e pela constante de dissociação intrínseca (SEGEL, 1975; WEBER, 1975).

$$\frac{F}{F_{\max}} = \frac{A}{K_d + A} \quad (2)$$

$$\frac{F}{F_{\max}} = \frac{A^n}{K' + A^n} \quad (3)$$

Os dados de fluorescência do equilíbrio que representam a saturação fracionada (0,10- 0,90) para a forma homotetramérica (MICHAELIS & MENTEN, 1913) da PfENR foram ajustados à equação (4) (equação de Hill), na qual Y é a fração de sítios de ligação do substrato ocupada pelo substrato, e h é o coeficiente de Hill.

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = h \log A - \log K' \quad (4)$$

O curso do tempo no estado pré-estacionário da conversão do NADH \rightarrow NAD⁺ foi inserido na equação (5) para um decaimento exponencial simples, na qual A é a absorbância no tempo t , A_0 é a absorbância no tempo zero, e k é a constante de velocidade aparente de primeira ordem para a formação do produto.

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (5)$$

As constantes de velocidade aparentes de primeira ordem foram calculadas pela inserção das curvas de inativação tempo-dependentes de PfENR a uma equação integrada (equação 5) para estudos de inibição do tipo ligação lenta (RAWAT *et al.*, 2003; MORRISON & WALSH, 1988; LIU *et al.*, 2002). Para equação (6), A_t e A_0 correspondem a absorbância, a 340 nm, no tempo t e no tempo 0, v_0 , v_s e k_{obs} representam, respectivamente, a velocidade inicial, a velocidade do estado estacionário final, e a constante de velocidade de primeira ordem aparente para o estabelecimento do equilíbrio entre os complexos EI e EI* (a constante de velocidade observada para a formação de EI* ou a constante de velocidade da isomerização aparente).

$$A_t = v_s t + \frac{(v_0 - v_s)(1 - e^{-k_{obs}t})}{k_{obs}} \quad (6)$$

Uma estimativa da constante de dissociação aparente (K_i^{app}) foi obtida pela inserção da variação da velocidade inicial (v_0), com a concentração do inibidor (I) na equação (7) para inibição competitiva, na qual v_{0max} é a velocidade inicial na ausência de inibidor (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

$$v_0 = \frac{v_{0max}}{1 + \frac{[I]}{K_i^{app}}} \quad (7)$$

Um valor "verdadeiro" para a constante de dissociação aparente K_i referente ao complexo binário enzima-inibidor inicial (EI) pode ser calculado pela equação (8), na qual K_{NADH} e $K_{Crotonoil-CoA}$ são os valores para as constantes de Michaelis-Menten, e $[NADH]$ e $[Crotonoil-CoA]$ são os valores das concentrações dos substratos utilizados no ensaios de inibição de ligação lenta.

$$K_i = \frac{K_i^{app}}{1 + \frac{[NADH]}{K_{NADH}} + \frac{[Crotonoil-CoA]}{K_{Crotonoil-CoA}}} \quad (8)$$

Os dados dos estudos do mecanismo de dois passos para a inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II foram inseridos na equação (9), na qual K_i é a constante de dissociação para o complexo binário enzima-inibidor inicial (EI), k_5 é a constante de velocidade de isomerização para a conversão de EI em EI*, k_6 é a constante de velocidade de isomerização reversa (conversão de EI* para EI), I é a concentração do inibidor, e k_{inat} é a constante de primeira ordem aparente para a inibição da enzima.

$$k_{inat} = k_6 + \frac{k_5 I}{K_i + I} \quad (9)$$

4. RESULTADOS

4.1- Análise por Bioinformática

Ao se submeter a sequência de aminoácidos da PfENR a um alinhamento, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), obteve-se como resultado que a PfENR apresenta maior similaridade com a ENR das plantas, tais como *Nicotiana tabacum* (CAA74177.1- 93% de similaridade), *Brassica napus* (CAC41367.1- 84%) e *Arabidopsis thaliana* (CAA74175.1- 83%).

Quando a sequência de aminoácidos da PfENR (GI 86171049) foi submetida a um alinhamento com a sequência da MtlNhA (GI 66737267), obteve-se como resultado um score de 30,7% (13,4% de identidade) (**Figura 15**). Contudo, apesar do baixo percentual de identidade relacionado à sequência primária destas proteínas, as subunidades da PfENR e da MtlNhA apresentam estruturas terciárias muito similares, apresentando no interior da subunidade uma formação de cadeias em β -conformação, paralelas, flanqueadas por α -hélices, conectadas com as cadeias β por *loops* de variados comprimentos (PEROZZO *et al.*, 2002).

Dentre as diferenças observadas entre as estruturas terciárias da PfENR e da MtlNhA, destaca-se na primeira a existência de uma pequena estrutura em α -hélice, a α_3 , localizada na região do *loop* entre as cadeias β_3 e α_4 , que não está presente na estrutura da MtlNhA, mas, está presente na estrutura da ENR de *Brassica napus*. Além disto, a PfENR conta com uma inserção de 43 resíduos de aminoácidos de baixa complexidade, localizada na região do *loop* entre as cadeias α_7 e α_8 , próximo do centro catalítico da enzima, que não têm sido localizada nos mapas de densidade eletrônica. Por último, a MtlNhA apresenta o *loop* do sítio de

ligação do substrato com uma conformação mais aberta, enquanto que a PfENR apresenta este mesmo *loop* em uma conformação mais fechada (Ibid.)

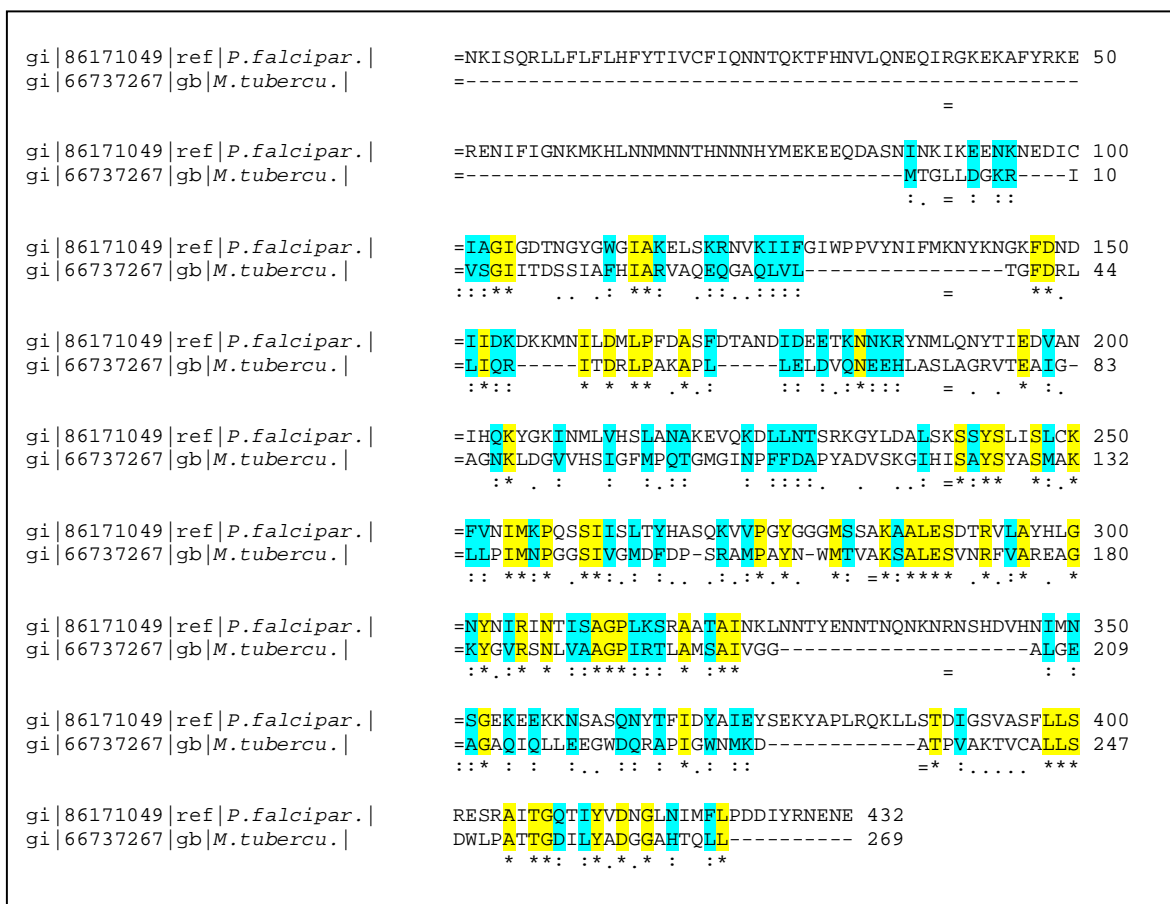


Figura 15: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas PfENR (432 aminoácidos) e MtlInA (269 aminoácidos). Em destaque *amarelo*: resíduos de aminoácidos idênticos; Em *azul*: resíduos de aminoácidos correspondentes
Fonte: EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

4.2- Expressão e purificação da PfENR em plasmídio pGS-21a

4.2.1 – Testes de expressão da PfENR clonada em plasmídio pGS-21a

Os resultados dos testes de expressão da PfENR/pGS-21a, em cepa observados em gel de poliácridamida, não permitiram a identificação de uma banda correspondente a uma expressão significativa da proteína PfENR, de

aproximadamente 63 kDa. Não houve diferença significativa de expressão também entre as amostras induzidas e não-induzidas, bem como entre as amostras crescidas a 37°C ou a 30°C.

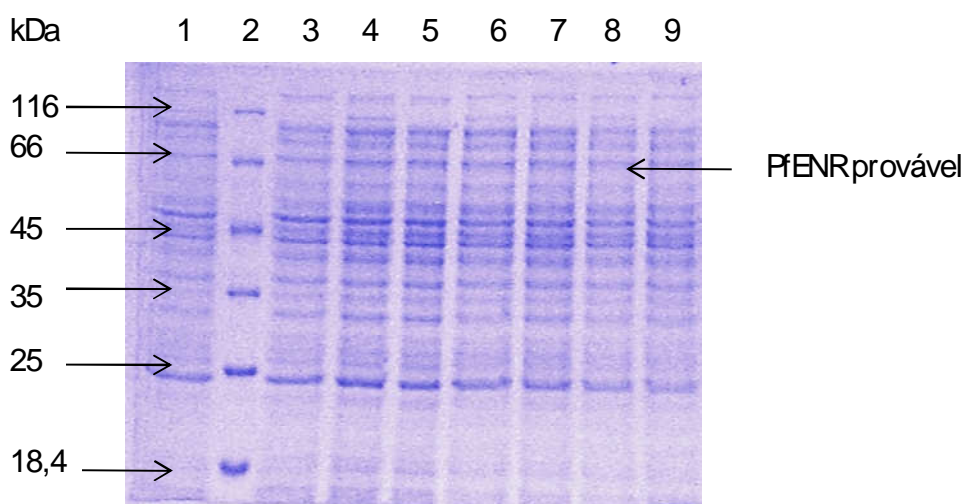


Figura 16. Análise em SDS PAGE 12% da fração solúvel de *E. coli* BL21(DE3) pLysS/ pGS-21a/PfENR, cultivadas a 37°C. Coluna 2: marcador de peso molecular *Protein Weight Marker* (Fermentas); Colunas 1, 4, 6 e 8: amostras induzidas com IPTG por 4, 8, 12 e 24 horas, respectivamente. Colunas 3, 5, 7 e 9: amostras não-induzidas, cultivadas por 4, 8, 12 e 24 horas, respectivamente

A partir dos resultados dos testes de expressão (**Figura 16**), foram padronizadas as seguintes condições de trabalho para a expressão da PfENR: cepa BL21(DE3) pLysS, cultivo bacteriano realizado a 37°C, não indução com IPTG e crescimento bacteriano por 12 horas, após alcançar uma OD₆₀₀ de 0,4 – 0,6.

4.2.2- Purificação da proteína PfENR expressa em pGS-21a

Apesar do resultado do baixo nível de expressão da PfENR observado no gel de poliacrilamida, decidiu-se por dar continuidade ao estudo, realizando a

purificação da proteína por cromatografia de afinidade (Ni^{+2}). A **Figura 17** apresenta o perfil protéico das amostras coletadas da coluna de níquel, no qual se identifica a presença da PfENR e de inúmeros contaminantes.

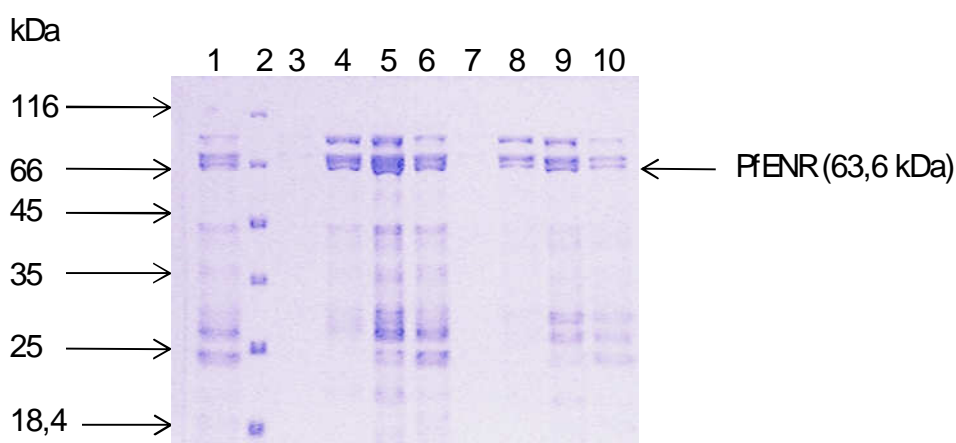


Figura 17. Análise em SDS PAGE 12% das proteínas eluídas em etapa de purificação em cromatografia de afinidade (Ni^{+2}). Coluna 2: marcador de peso molecular *Protein Weight Marker* (Fermentas); Colunas 1, 3-10: amostras eluídas diversas

Na tentativa de melhorar a pureza da amostra de PfENR, uma nova etapa de purificação foi realizada com a união das amostras (1, 4, 5, 6, 8, 9 e 10) eluídas da coluna de níquel. Desta vez foi utilizada uma coluna aniônica, a Mono Q da Pharmacia Biotech. O resultado desta segunda etapa de purificação pode ser observado na **Figura 18**, na qual se evidencia a presença da PfENR e de um número reduzido de contaminantes, quando comparado a etapa anterior.

Com o resultado da segunda etapa de purificação optou-se por determinar a concentração protéica da amostra, para, em seguida, realizar o ensaio de atividade enzimática da PfENR. As amostras que são observadas na **Figura 18** foram agrupadas em apenas 2 alíquotas, referentes aos dois picos de absorção distintos

observados durante a cromatografia em coluna MonoQ: o primeiro pico composto pelas amostras 1, 2 e 4 e o segundo pico constituído pelas amostras 5, 6 e 7.

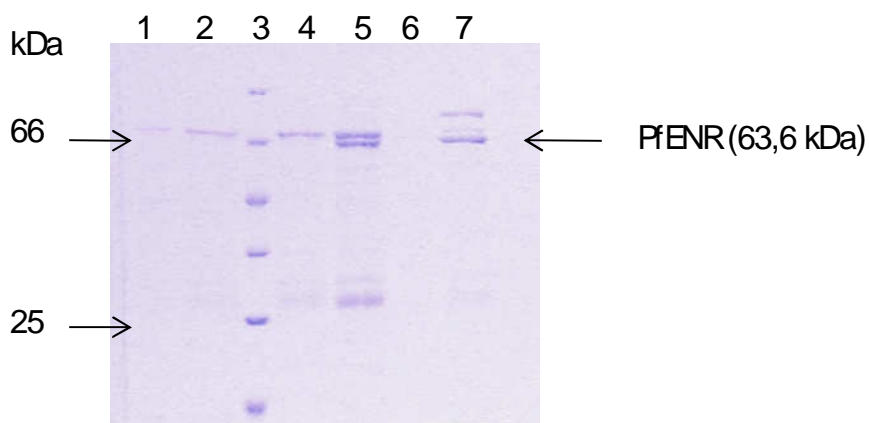


Figura 18. Análise em SDS PAGE 12% das proteínas eluídas em etapa de purificação em cromatografia de troca aniônica (Mono Q). Coluna 3: marcador de peso molecular *Protein Weight Marker* (Fermentas); Colunas 1, 2 e 4: amostras eluídas- pico 1; 5-7: amostras eluídas- pico 2

4.2.3- Determinação da concentração protéica da PfENR

Após o processo de purificação, a concentração final da amostra de PfENR foi determinada por método colorimétrico (Bradford). A amostra 1 da PfENR (pico 1) apresentou a concentração de 0,10 mg/mL, enquanto a amostra 2 da PfENR (pico 2) apresentou a concentração de 0,31 mg, o que corresponde a um baixo-rendimento para um volume inicial de cultura de 1,0 L.

4.2.4- Avaliação da atividade enzimática da PfENR

O ensaio enzimático realizado com a enzima PfENR purificada neste trabalho mostrou que ambas as amostras, 1 e 2, estavam funcionalmente ativas,

todavia, a amostra 2, mais concentrada, apresentou atividade 12x menor que a PfENR produzida pela empresa GenScript Corporation, sendo que esta última encontrava-se apenas 6x mais concentrada que a primeira (**Tabela 1**). A amostra 2 apresentou atividade 100x menor que a amostra de referência (Genscript Corporation), sendo 19x menos concentrada que esta.

Tabela 1: Avaliação da atividade enzimática das amostras de PfENR

Enzima	Concentração (mg/mL)	Atividade (ΔAbs/min)
PfENR Genscript	1,94	0,01113
PfENR – amostra 1	0,10	0,00011
PfENR – amostra 2	0,31	0,00090

Estes resultados indicam a necessidade de aperfeiçoamento da metodologia de trabalho, visando à otimização do nível de expressão protéica, bem como também, o aperfeiçoamento das técnicas de purificação, de forma a favorecer a obtenção de uma amostra em grau de pureza maior.

Os estudos de padronização da expressão em alto nível e da purificação da PfENR em alto grau de pureza permanecem em andamento no Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEPEM/RO). Recentemente, foram obtidos nesta Instituição melhores resultados do processo de purificação da PfENR clonada em pGS-21a, no qual esta proteína foi purificada através de uma única etapa em coluna de agarose-

níquel *ProBond* da Invitrogen (**Figura 19**). Para este experimento foi realizada anteriormente a expressão, em 50 mL de cultura bacteriana, de dois clones distintos da PfENR, ambos sintetizados pela empresa GenScript e clonados no vetor pGS-21a: o primeiro codificando uma PfENR com 423 aminoácidos (48,7 kDa) e o segundo codificando a PfENR utilizada neste estudo, com 432 aminoácidos (63,6 kDa).

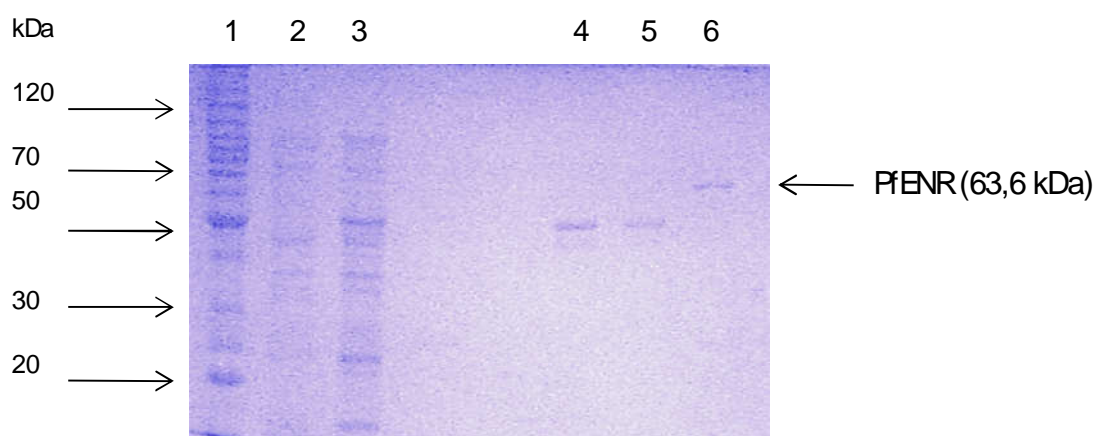


Figura 19. Análise em SDS PAGE 12% das proteínas PfENR eluídas em etapa de purificação em cromatografia de afinidade (Ni^{+2}). Coluna 1: marcador de peso molecular *BenchMark Protein Lader* (Invitrogen); Coluna 2: Extrato bruto de BL21 DE3 pLysS; Coluna 3: Extrato bruto de BL21 DE3 pLysS/pGS-21a/PfENR (48,7 kDa); Colunas 4 e 5: PfENR (48,7 kDa); Coluna 6: PfENR (63,6 kDa)

Neste procedimento de purificação, realizado em etapa única, a PfENR (63,6 kDa) apresentou um grau de pureza maior (**Figura 19**, coluna 6) do que aquele que foi anteriormente obtido na purificação em duas etapas (**Figura 18**). As proteínas purificadas foram quantificadas pelo método de Bradford: PfENR (48,7 kDa) = 1,48 mg/mL; PfENR (63,6 kDa) = 0,45 mg/mL. A avaliação da atividade enzimática foi positiva para ambas as amostras, todavia, a PfENR (48,7 kDa) apresentou atividade enzimática 100x maior que a PfENR (63,6 kDa).

Os resultados seguintes apresentados neste trabalho, referentes aos ensaios de determinação dos parâmetros cinéticos e de inibição da PfENR, foram obtidos com a utilização da PfENR (E.C.1.3.1.9) expressa e purificada pela empresa GenScript Corporation, New Jersey, USA.

4.3 - Velocidade inicial e determinação de parâmetros cinéticos

Os padrões de velocidade inicial foram determinados utilizando-se Crotonoil-CoA ou NADH como substrato variável para distinguir entre um mecanismo sequencial e um mecanismo de deslocamento duplo ("ping-pong"), fornecendo informações quanto à ordem de ligação do substrato.

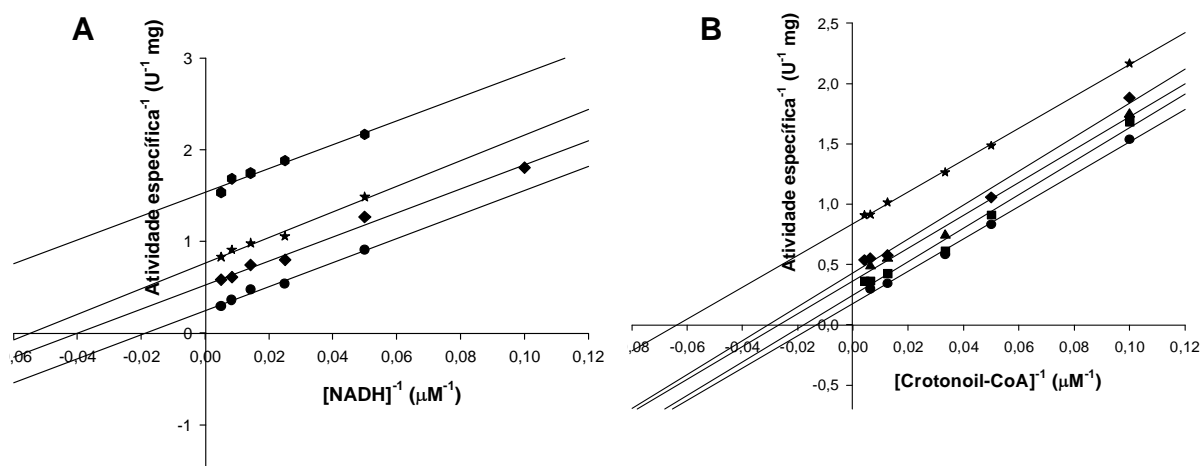


Figura 20. Padrões de intersecção da velocidade inicial da PfENR com NADH (A) ou Crotonoil-CoA (B) como substrato variável. Cada curva representa concentrações variáveis-fixas do co-substrato: (A) As concentrações do Crotonoil-CoA foram (●) 10 μM , (★) 20 μM , (◆) 30 μM , e (●) 240 μM ; (B) As concentrações do NADH foram (★) 20 μM , (◆) 40 μM , (▲) 70 μM , (■) 120 μM , (●) 200 μM . Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μmol de Crotonoil-CoA por minuto em um caminho óptico de 1 cm

Fonte: MEDEIROS: *et al.*, 2011.

A análise do gráfico dos duplo-recíprocos (LINEWEAVER & BURK, 1934) revelou um padrão de linhas paralelas para ambos os substratos (**Figura 20**), o que é consistente com o mecanismo de deslocamento duplo.

Os dados obtidos com este experimento foram inseridos na equação (1), gerando os seguintes valores para as constantes cinéticas verdadeiras no estado estacionário: $V_{\text{máx}} = 5,8 (\pm 0,3) \text{ U mg}^{-1}$; $k_{\text{cat}} = 6,2 (\pm 0,4) \text{ s}^{-1}$; $K_{\text{NADH}} = 85 (\pm 9) \mu\text{M}$; $K_{\text{Crotonoil-CoA}} = 63 (\pm 6) \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}}/K_{\text{NADH}} = 7,3 (\pm 0,9) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; e $k_{\text{cat}}/K_{\text{Crotonoil-CoA}} = 9,8 (\pm 1,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Na análise estatística foram obtidos os seguintes valores: $R^2 = 0,9851$; $F = 1055,7897$ e $P < 0,0001$.

4.4 - Equilíbrio de ligação dos ligantes NADH e Butiril-CoA à PfENR

Experimentos de formação do complexo binário em equilíbrio foram realizados para confirmar, ou refutar, o mecanismo enzimático proposto. Houve um aumento na fluorescência do nucleotídeo após a ligação do NADH à PfENR, enquanto que a ligação do Butiril-CoA à PfENR resultou em atenuação intrínseca da fluorescência da proteína (**Figura 21**).

A titulação de PfENR com NADH gerou uma hipérbole (**Figura 21A**), os dados produzidos foram inseridos na equação (3) produzindo um valor de $398 (\pm 53) \mu\text{M}$, para a constante de dissociação global (K_d) do NADH ($R^2 = 0.9973$; $F = 11462.1368$; $P = < 0.0001$). A titulação da PfENR com Butiril-CoA gerou uma curva sigmóide (**Figura 21B**), e os dados foram melhor ajustados a equação (4), produzindo um valor K' para o Butiril-CoA de $1.151 (\pm 638) \mu\text{M}$ ($R^2 = 0.9881$; $F = 1245.7089$; $P = < 0.0001$).

O valor para K representa uma constante de dissociação média para a formação do complexo binário PfENR: Butiril-CoA, o qual é composto por fatores de interação e pela constante de dissociação intrínseca (SEGEL, 1975; WEBER, 1975).

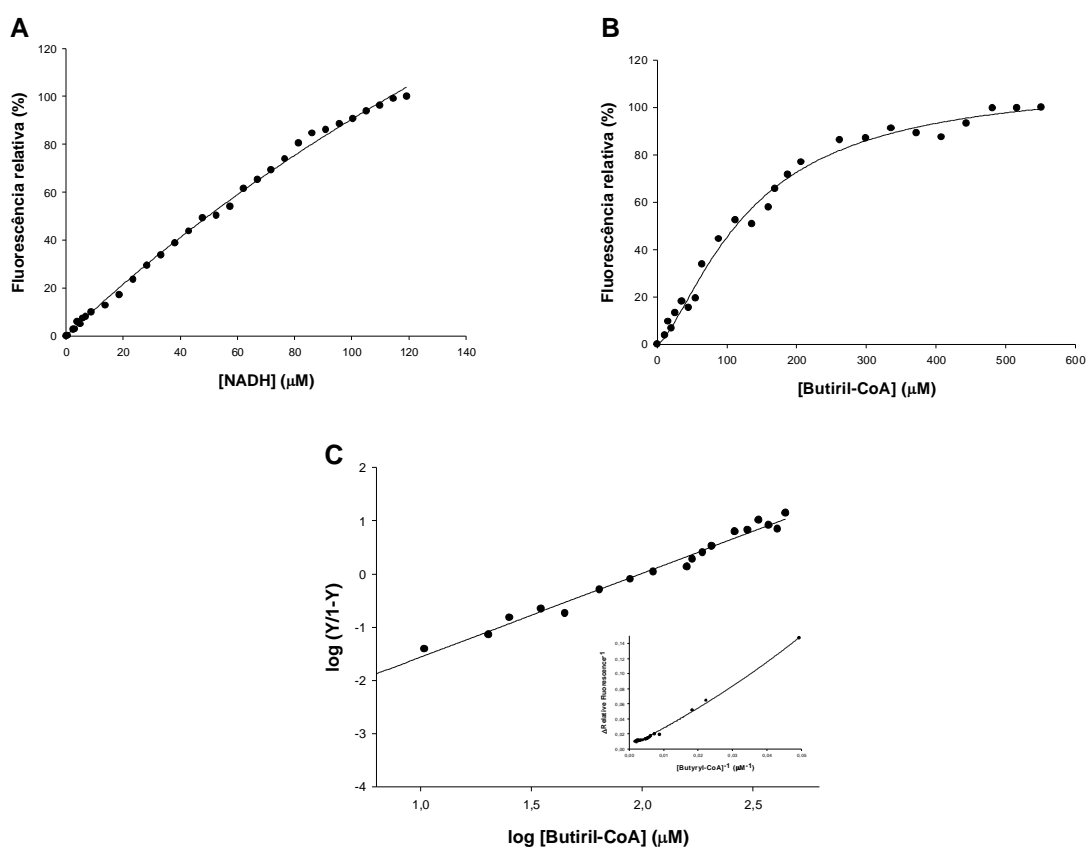


Figura 21. Constante de dissociação global para a formação do complexo binário PfENR:NADH (A) e PfENR:Butiril-CoA (B). As alterações foram monitoradas, respectivamente, através da fluorescência intrínseca do nucleotídeo e da proteína. (C) Gráfico logarítmico de Hill para dados obtidos no intervalo de 10% a 90% de saturação do sítio ativo da PfENR com Butiril-CoA. Na parte interna encontra-se o gráfico duplo-recíproco dos dados de fluorescência para uma equação de crescimento exponencial.
Fonte: MEDEIROS: *et al.*, 2011.

Os dados inseridos na equação de Hill (**Figura 21C**), ajustados à equação (5) produziram um valor maior que um para h ($1,6 \pm 0,1$). Este último indica cooperatividade homotrópica, positiva e moderada na ligação do Butiril-CoA à

PfENR tetramérica, fato que é apoiado pela curva ascendente do gráfico do duplo-recíproco (**Figura 21C - interior**).

Nenhuma alteração na fluorescência intrínseca da PfENR, ocasionada pela adição de Crotonoil-CoA foi observada, sugerindo que este composto não pode ligar-se a enzima PfENR livre. A titulação de fluorescência da PfENR com NAD⁺ não pôde ser realizada devido ao grande efeito de fluorescência intrínseca (*inner filter*) apresentado por este composto individualmente.

4.5 – Cinética da PfENR no estado pré-estacionário

Os dados provenientes do experimento do estado pré-estacionário apresentaram uma curva de decaimento exponencial simples relativa à conversão do NADH → NAD⁺ (**Figura 22**).

A inserção dos dados na equação (5), resultou no valor de $1.100 (\pm 29) \text{ s}^{-1}$ para a constante de velocidade aparente de primeira ordem (k_{obs}) para a formação do produto (1 cm de caminho óptico; $R^2 = 0.9944$; $F = 4155.9084$; $P = <0.0001$). Desta forma, o passo da conversão NADH → NAD⁺ não apresenta qualquer contribuição para a(s) etapa(s) limitante(s) da velocidade, sendo o seu valor muito maior do que o valor da constante da velocidade catalítica.

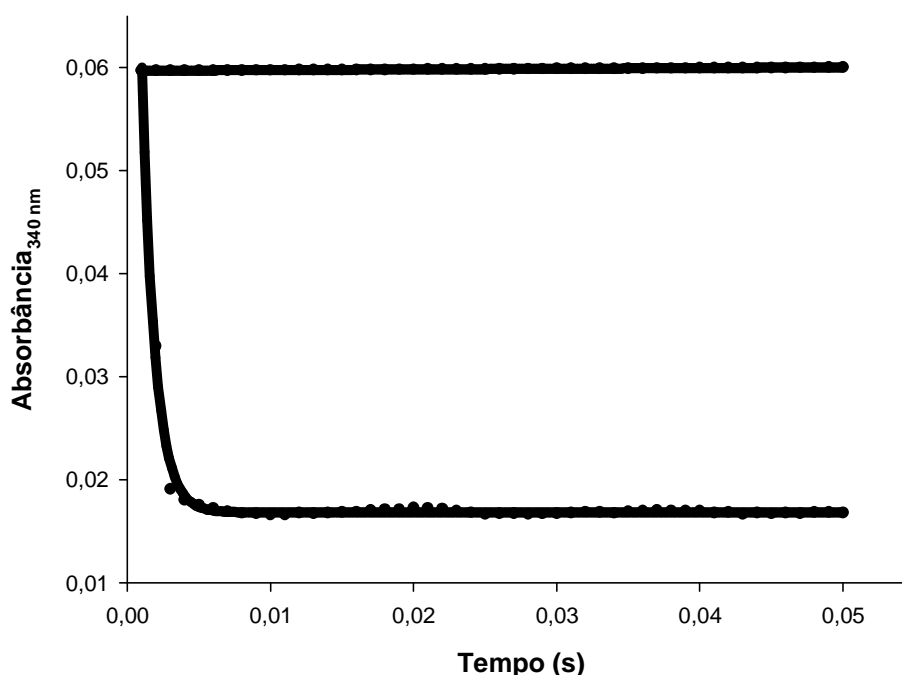


Figura 22. Representação da curva do experimento *stopped-flow* referente à conversão do NADH→NAD⁺. A inserção dos dados da curva de decaimento exponencial à Eq. (5) produziu um valor de 1.100 (± 29) s⁻¹ para a constante de velocidade aparente de primeira ordem relativa à formação do produto. A linha superior representa o controle químico (NADH 200 µM) e a curva de decaimento exponencial representa a reação após a mistura de PfENR 3,14 µM e NADH 200 µM (concentrações da câmara de mistura).
Fonte: MEDEIROS: *et al.*, 2011.

Houve um acúmulo aparente de produto observável (NAD⁺) nos sítios ativos da enzima quando alta concentração de PfENR (3,14 µM) foi misturada com NADH (200 µM).

4.6- Atividade *in vitro* do composto pentaciano (isoniazida) ferrato II contra a PfENR

Antes de empreender uma análise completa do modo de inibição da atividade da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II, foi realizado um experimento para verificar inicialmente se este composto causava, ou não, inibição tempo-dependente da atividade da PfENR. Para tanto, a enzima (5,53 µM) foi pré-

incubada com uma concentração fixa do inibidor (2.454 μM), e, por conseguinte, alíquotas da mistura enzima:inibidor (0,12:54 μM na reação) foram retiradas em tempos distintos para medir a atividade residual restante.

Os dados obtidos neste experimento revelam que a inibição da atividade da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II ocorre de forma tempo-dependente, como se observa na **Figura 23**, com a diminuição gradual da atividade relativa da PfENR, ao longo do tempo de contato enzima:inibidor ($R^2 = 0.9906$; $F = 211.8699$; $P = 0.0047$).

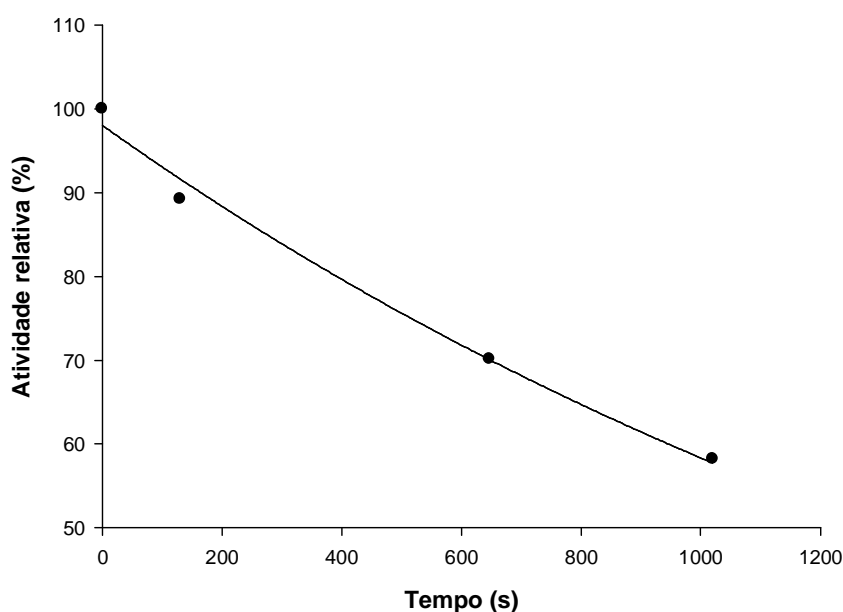


Figura 23. Inibição tempo-dependente da atividade da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II. A enzima foi pré-incubada com o inibidor por 15 min. (enzima 5,53 μM :inibidor 2.454 μM), após o que a atividade enzimática foi monitorada pela adição de alíquotas de 0,12:54 μM da mistura enzima:inibidor às misturas de reação contendo Crotonoil-CoA (40 μM) e NADH (50 μM).

4.7 – Cinética de inibição lenta da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II

Após o reconhecimento de que a inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II é tempo-dependente, experimentos de inibição lenta (*slow-onset inhibition*) foram realizados, na presença de várias concentrações do inibidor, na tentativa de elucidar o mecanismo de inibição desta enzima. A evolução das curvas referentes à atividade enzimática de PfENR indica que o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II é um inibidor de ação inicial lenta sobre esta enzima (**Figura 24**).

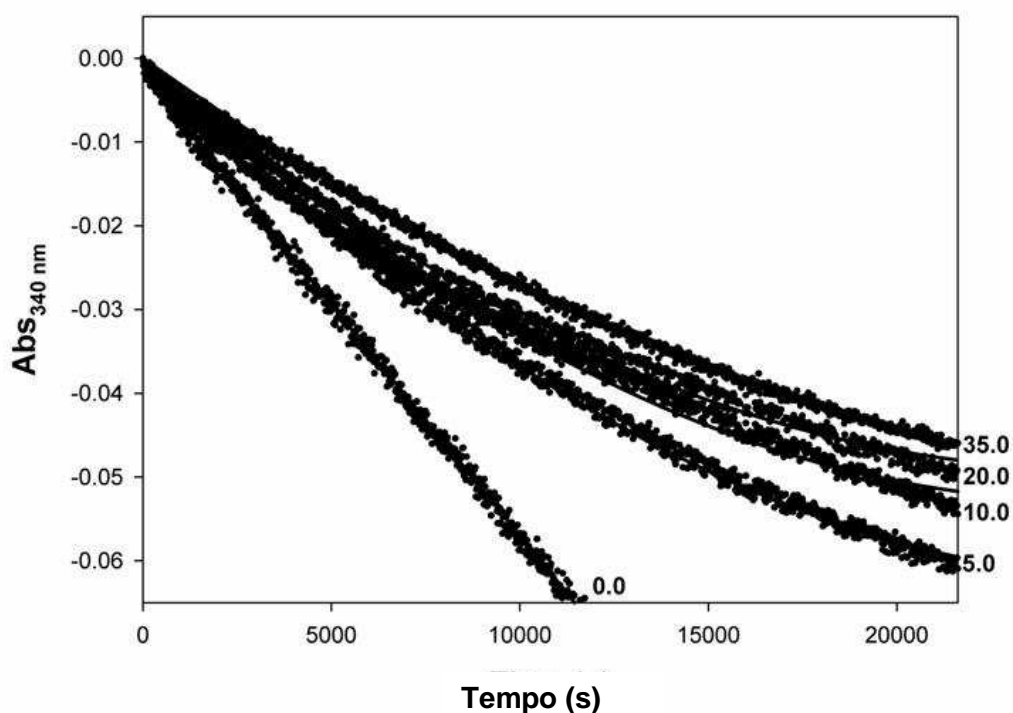


Figura 24. Inibição da PfENR por ação lenta (*slow-onset inhibition*) pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II. As curvas sólidas representam o melhor resultado de inserção dos dados à equação (5). As misturas de reação foram realizadas a 25°C, contendo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5, Crotonoil-CoA 80 μM , NADH 120 μM , glicerol 2 % (vol/vol), BSA 49,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e inibidor 0-35 μM . As reações foram iniciadas pela adição da enzima (0,69 nM) à mistura de reação e foram monitoradas pelo seguimento do decréscimo da absorvância do NADH a 340 nm por 21.600 s (6 horas)

Fonte: MEDEIROS: *et al.*, 2011.

A reta de maior inclinação, que se encontra sob as demais, representa a atividade enzimática na ausência do inibidor. As demais curvas representam concentrações crescentes do inibidor que se revelam por inclinações menores conforme o aumento da concentração deste na solução.

4.8 – Mecanismo de inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II

O mecanismo de inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II foi avaliado por um experimento no qual a enzima foi inicialmente pré-incubada na presença de várias concentrações do inibidor. Em intervalos apropriados foram retiradas alíquotas das soluções enzima-inibidor pré-incubadas e adicionadas à mistura de reação contendo os substratos, para, em seguida, realizar a medição rápida da velocidade inicial.

As constantes de velocidade aparente de primeira ordem, para a inativação da PfENR (k_{inat}) puderam ser calculadas a partir de uma curva da atividade enzimática residual versus tempo, para cada concentração de inibidor. Uma curva dos valores de k_{inat} versus concentração do inibidor mostra que os valores de k_{inat} aumentam hiperbolicamente em função da concentração do inibidor (**Figura 25**), o que é consistente com o mecanismo de inibição em duas etapas.

Desta forma, estes dados foram inseridos na equação (9), que descreve a inibição lenta para mecanismo de inibição em duas etapas, gerando os valores de $58 (\pm 12) \mu\text{M}$ para K_i , $53 (\pm 2) \text{ s}^{-1}$ para K_5 , e $4 (\pm 2) \text{ s}^{-1}$ para K_6 ($R^2 = 0.9968$; $F = 310.4536$; $P = 0.0032$). Um valor de $4 \mu\text{M}$ pôde assim ser calculado para a constante de inibição global ($K_i^* = K_i K_6 / (K_5 + K_6)$).

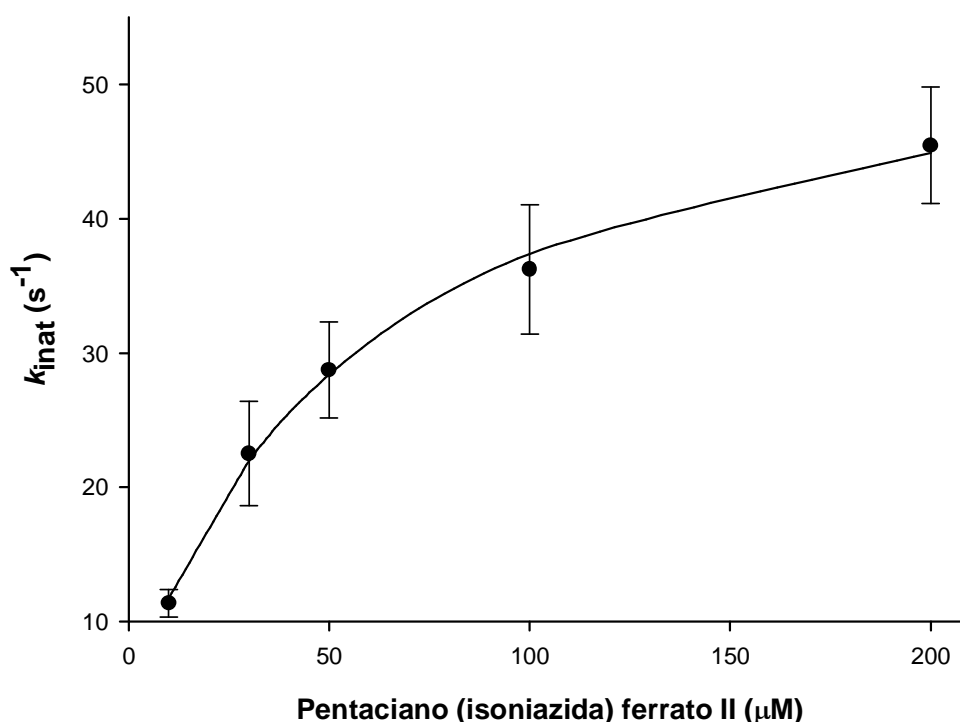


Figura 25. Inativação em duas etapas da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II. Os valores para as constantes de inativação aparentes de primeira ordem (k_{inat}) foram obtidos a partir de uma curva da atividade enzimática residual versus tempo (não apresentada). Os valores de k_{inat} foram plotados contra a concentração do inibidor na mistura de pré-incubação. Os dados obtidos foram inseridos na equação (6)
Fonte: MEDEIROS: *et al.*, 2011.

Deve-se salientar que uma estimativa independente para o valor de K_i^* pode ser obtida através da curva da velocidade final do estado estacionário (v_s) em função da concentração do inibidor, fixando os dados à equação (7) para inibição competitiva. No entanto, os dados não foram consistentes, de forma que os dados experimentais pareciam um pouco afastados dos valores previstos pelo ajuste dos dados à equação (6).

5. DISCUSSÃO

5.1 – Desenho racional de fármacos

A capacidade de realizar a descoberta de uma nova molécula com potencial terapêutico (princípio ativo) é a competência tecnológica mais avançada no processo de pesquisa e desenvolvimento farmacológico, quando comparada às tecnologias de produção industrial de fármacos e às técnicas de comercialização e marketing que são tarefas de mais fácil domínio, em termos de grau de complexidade tecnológica (VIEIRA & OHAYON, 2000).

Com o declínio da produtividade no desenvolvimento de novos medicamentos, diferentes abordagens para o chamado desenho racional de fármacos estão sendo introduzidas e desenvolvidas (PAULI *et al.*, 2009). O desenho racional é uma metodologia recente de pesquisa que utiliza os avanços da bioquímica molecular, farmacologia e enzimologia na produção de novos fármacos, possibilitando aos centros de pesquisa os meios para substituir o método de busca empírica e aleatória de substâncias de ação terapêutica e profilática, pela abordagem planejada e racional de um novo produto, mediante a utilização de moléculas específicas, desenhadas para agir em alvo metabólico determinado (VIEIRA & OHAYON, 2000).

Neste cenário, a abordagem moderna no desenvolvimento de novos fármacos contra doenças negligenciadas, entre estas a malária e a tuberculose, está baseada no uso de alvos moleculares definidos, selecionados devido à importância estratégica das rotas metabólicas das quais fazem parte, e, geralmente relacionadas a etapas críticas do desenvolvimento do parasita (VASCONCELOS *et al.*, 2008).

Esta nova abordagem apresenta vantagens significativas quando comparada aos métodos tradicionais, uma vez que se estabelece antecipadamente a especificidade do bioativo e respectivo mecanismo de ação (BASSO *et al.*, 2005).

Um alvo ideal para o desenvolvimento de fármacos contra agentes infecciosos deve ser essencial para a sobrevivência do patógeno e estar ausente no hospedeiro. Dentro desta proposta, a enzima 2-*trans* enoil-ACP redutase (PfENR) é alvo validado e promissor para o desenvolvimento de agentes antimaláricos, pois catalisa a reação principal do processo de biossíntese dos ácidos graxos, rota de importância vital para o parasita, bem como encontra-se ausente no hospedeiro humano (GORNICKI, 2003). Desta forma, o conhecimento do mecanismo de ação desta enzima apresenta importância significativa para a pesquisa de novos inibidores da via de biossíntese de ácidos graxos, com potencial terapêutico.

5.2 – Parâmetros cinéticos verdadeiros e mecanismo de ação da PfENR

Um dos objetivos do presente estudo foi realizar a caracterização dos parâmetros cinéticos verdadeiros da PfENR no estado estacionário, uma vez que os parâmetros cinéticos desta enzima encontrados na literatura são aparentes, ou seja, K_M e $V_{máx}$ para cada substrato foram determinados a uma concentração fixa do outro (KAPOOR *et al.*, 2001), ou a uma concentração fixa e saturante do outro (PEROZZO *et al.*, 2002).

Para determinar os parâmetros cinéticos verdadeiros em estado estacionário e os padrões de velocidade inicial visando à distinção dos mecanismos, as medidas de atividade enzimática devem ser realizadas na presença de concentrações variadas de um substrato e várias concentrações fixas do outro

substrato. Neste estudo a realização do ensaio enzimático da velocidade inicial ocorreu na presença de concentrações diversas de Crotonoil-CoA (10-240 μM) e várias concentrações fixas de NADH (20-220 μM), permitindo a determinação dos parâmetros cinéticos verdadeiros da PfENR.

A **Tabela 2** apresenta, além dos valores aparentes de K_M para PfENR disponíveis na literatura, valores de K_M para ENR de outros três organismos para as quais foi utilizado Crotonoil-CoA como substrato: *B. napus*, *H. influenzae* e *E. coli*.

TABELA 2: Valores de K_M para a enoil redutase (ENR) de diferentes organismos

Organismo (Referência)	K_M (μM) Crotonoil-CoA	K_M (μM) NADH
<i>Plasmodium falciparum</i> (presente estudo)	63 (\pm 6)	85 (\pm 9)
<i>Plasmodium falciparum</i> (KAPOOR <i>et al.</i> , 2001)	165 (\pm 15)	33 (\pm 3)
<i>Plasmodium falciparum</i> (PEROZZO <i>et al.</i> , 2002)	48 (\pm 3)	30 (\pm 3)
<i>Brassica napus</i> (FAWCETT <i>et al.</i> , 2000)	253	9,5
<i>Haemophilus influenzae</i> (Marcinkeviciene <i>et al.</i> ; 2001)	7.300 (\pm 0,4)	72 (\pm 0,4)
<i>Escherichia coli</i>	2700	NR

Fonte: Adaptado de PEROZZO *et al.*, 2002. NR: significa *não registrado*

O valor verdadeiro do $K_{\text{NADH}} = 85 (\pm 9) \mu\text{M}$ encontrado neste estudo é 2,5 vezes maior do que os valores aparentes citados na literatura para a PfENR (33 ± 3

μM), todavia, encontra-se próximo do valor apresentado para a HiENR ($72 \pm 0,4$). Por outro lado, o valor verdadeiro obtido neste estudo para o $K_{\text{Crotonoil-CoA}} = 63 (\pm 6)$ μM é compatível com o valor aparente encontrado para a PfENR (48 ± 3), relatado por Perozzo (2002), e 2,6 vezes menor que o valor aparente para a PfENR (165 ± 15) relatado por Kapoor (2001).

A análise do gráfico dos duplo-recíprocos (LINEWEAVER & BURK, 1934), gerados com os dados do experimento de Velocidade Inicial, revelou um padrão de linhas paralelas para ambos os substratos (**Figura 20**), o que é consistente com o mecanismo de deslocamento duplo (“ping-pong”). No mecanismo de deslocamento duplo, um evento catalítico pode ocorrer quando somente um dos dois substratos está ligado à enzima. Desta forma, um evento catalítico ocorre após a ligação do substrato “A” à enzima (E), todavia, este evento ocorre antes da ligação do substrato “B.” Após o primeiro evento catalítico, uma porção do substrato “A” permanece no sítio ativo da enzima, enquanto a outra parte, conhecida como produto “P” se dissocia da enzima. O primeiro evento catalítico produz uma forma da enzima diferente e estável (F), a qual o substrato “B” pode ligar-se e prosseguir com a catálise para gerar o produto “Q” e regenerar a enzima livre (E).

Há, no entanto, algumas situações nas quais as retas que parecem ser paralelas, na verdade não são. Para um sistema ordenado Bi Bi no qual a constante de dissociação para o substrato “A” (K_{ia}) é muito menor do que a constante de Michaelis-Menten para “A” (K_a ou K_{MA}), o conjunto das retas cruzam muito para a esquerda do eixo $1/v$ e muito abaixo do eixo $1/[A]$ (SEGEL, 1975). Além disso, padrões de velocidade inicial semelhantes podem também ocorrer em sistemas de equilíbrio rápido aleatório, nos quais a ligação de um substrato inibe fortemente a ligação do outro.

Para confirmar, ou refutar o mecanismo enzimático proposto para a PfENR, com base nos experimentos de “Velocidade Inicial”, foram realizados experimentos de espectrofluorimetria para verificação da formação do complexo binário em equilíbrio. Como resultado, ocorreu um aumento na fluorescência do nucleotídeo após a ligação do NADH à PfENR, enquanto que a ligação do Butiril-CoA à PfENR resultou em atenuação intrínseca da fluorescência da proteína (**Figura 21**). Nenhuma alteração na fluorescência intrínseca da proteína PfENR, ocasionada pela adição de Crotonoil-CoA foi observada, sugerindo que este composto não pode ligar-se a enzima PfENR livre.

Como foi visto anteriormente, os dados obtidos com os experimentos de cinética do estado estacionário sugerem que a PfENR apresenta um mecanismo de deslocamento duplo (“ping-pong”), enquanto os dados de espectroscopia de fluorescência demonstraram que o NADH liga-se à enzima livre, enquanto que, aparentemente, Crotonoil-CoA não se liga. Embora a ligação do Butiril-CoA com a enzima livre tenha resultado em diminuição da fluorescência da proteína, não há certeza se Crotonoil-CoA não pode ligar-se à enzima livre, ou se a sua ligação não provoca alteração na fluorescência da proteína. Desta forma, os mecanismos, ordenado Bi Bi e equilíbrio rápido aleatório, não poderiam ser descartados.

Na tentativa de esclarecimento sobre o mecanismo da reação catalisada pela PfENR, medições cinéticas do estado pré-estacionário foram realizadas para demonstrar se há ou não transferência de hidreto na ausência de Crotonoil-CoA, como esperado para o mecanismo “pin-pong”, com NADH ligando primeiro. Por outro lado, a determinação de um valor para a constante de velocidade aparente de primeira ordem para a conversão de $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ também pode indicar, ou não, se este passo é limitante da velocidade da reação. Deve-se salientar que a

concentração de NADH estava em excesso, quando comparada à concentração da PfENR, de forma que qualquer ruptura na formação do produto poderia ser confiavelmente avaliada (HIROMI, 1979; BASSO *et al.*, 1995).

Os dados provenientes do experimento do estado pré-estacionário apresentaram uma curva de decaimento exponencial simples relativa à conversão do $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ (**Figura 22**). A inserção dos dados gerados neste experimento na equação (5) resultou no valor de $1.100 (\pm 29) \text{ s}^{-1}$ para a constante de velocidade aparente de primeira ordem (k_{obs}) para a formação do produto. Isto indica que o passo da conversão $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$ não apresenta qualquer contribuição para a(s) etapa(s) limitante(s) da velocidade, sendo o seu valor muito maior do que o valor da constante da velocidade catalítica.

Tomados juntos, os resultados obtidos nos experimentos de cinética do estado estacionário, cinética do estado pré-estacionário, e os de equilíbrio de ligação são consistentes com um mecanismo de deslocamento duplo para PfENR (**Figura 26**).

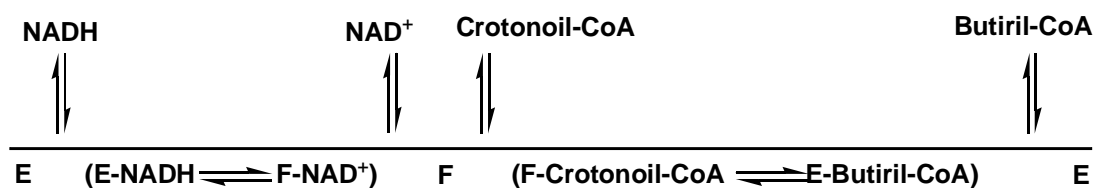


Figura 26. Mecanismo proposto para a reação química catalisada pela PfENR.
Fonte: MEDEIROS: *et al.*, 2011.

Tem sido descrito na literatura a existência de mecanismo sequencial ordenado, com o substrato enoil-ACP ligando-se primeiro, para a enoil redutase de

Staphylococcus aureus (XU *et. al.*, 2008), e ordenado sequencial, com NADH ligando primeiro, para a enoil redutase codificada pelo gene *fabV* de *Burkholderia mallei* (LU & TONGE, 2010) e para a enoil redutase de *Brassica napus* (FAWCETT *et. al.*, 2000). Há também os relatos de mecanismo cinético de equilíbrio rápido aleatório para a enoil redutase de *Haemophilus influenzae* (MARCINKEVICIENE *et. al.*, 2001) e o de mecanismo cinético ordenado aleatório para a enoil redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (VASCONCELOS *et. al.*, 2010). Apesar de serem incomuns para redutases/desidrogenases, os mecanismos de deslocamento duplo têm sido descritos para nitrorredutase de *Enterobacter cloacae* (KODER & MILLER, 1998), histidinol desidrogenase de *Salmonella typhimurium* (GORISCH, 1979), dihidroorotato desidrogenase mitocondrial de fígado bovino (HINES & JOHNSTON, 1989), e para o complexo piruvato desidrogenase de mamíferos (TSAI *et al.*, 1973).

Com base em resultados de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), em estudos de ligação do substrato à PfENR imobilizada, tem sido proposto para a PfENR o mecanismo ordenado aleatório para a ligação do substrato (KAPOOR *et al.*, 2004). Embora existam na literatura relatos sobre a determinação dos parâmetros cinéticos aparentes em estado estacionário para a PfENR (KAPOOR *et al.*, 2004; PEROZZO *et al.*, 2002; KAPOOR *et al.*, 2001), não foram apresentados, até o presente momento, dados relativos à determinação dos parâmetros cinéticos verdadeiros do estado estacionário, sobre os quais se possa consolidar uma proposta que elucide o mecanismo desta enzima em solução.

Os dados gerados neste estudo através de medidas espectrofluorimétricas da formação do complexo binário PfENR:NADH possibilitaram a determinação da constante de dissociação global do NADH em equilíbrio: $K_d = 398 (\pm 53) \mu\text{M}$. Curiosamente, este valor é aproximadamente 8 vezes maior do que um valor

previamente relatado na literatura (51,6 μM), obtido através da técnica de SPR (KAPOOR *et al.*, 2004). Estes resultados são discordantes entre si, o que é pouco usual. Em geral, as constantes de equilíbrio determinadas por SPR são consonantes com os valores obtidos através de técnicas de solução (espectroscopia de fluorescência, microcalorimetria). Além deste fato, um valor de K_d de 62,5 μM para Crotonoil-CoA redutase foi determinado por medidas SPR (KAPOOR *et al.*, 2004), enquanto que, no presente trabalho, não se pode detectar nenhuma alteração na fluorescência intrínseca da proteína PfENR após a adição de Crotonoil-CoA à enzima livre.

Apresenta-se aqui uma questão sutil, a da busca de um entendimento final sobre o mecanismo da reação da PfENR utilizando para isto resultados díspares oriundos de dois trabalhos realizados com técnicas distintas de investigação. Quando se compara os procedimentos técnicos utilizados nos dois trabalhos (MEDEIROS *et al.*; 2011 e KAPOOR *et al.*, 2004) referentes à investigação sobre o mecanismo cinético da PfENR, encontram-se várias características distintas, entre as quais destacam-se algumas elencadas na **Tabela 3**.

Cada característica apresentada na **Tabela 3** desecadeia por si mesma algum efeito que, visto em sua individualidade, pode gerar alterações no resultado final dos experimentos aos quais estão vinculados. Seja a constituição da proteína PfENR, que apresenta um diferencial de 72 resíduos de aminoácidos a mais no presente estudo; ou o grau diferenciado de pureza destas amostras protéicas; ou ainda, as particularidades da técnica de SPR, que somente mais recentemente vem sendo utilizada em estudos de cinética enzimática, e que apresenta limitações impostas pelo transporte de massa, tamanho pequeno do analito, entre outros (MYSZKA, 1997), ao contrário das metodologias clássicas utilizadas neste estudo;

quer seja simplesmente uma alteração em 5°C na temperatura do ensaio, e já se tem o suficiente para desencadear processos de estudos comparativos, nos quais as variantes encontradas nos dois experimentos poderiam ser investigadas.

TABELA 3: Caracterização de duas metodologias de trabalho utilizadas em estudos do mecanismo cinético da enzima 2-*trans*-enoil-ACP-redutase de *P. falciparum* (PfENR)

Materiais e Métodos	MEDEIROS <i>et al.</i>, 2011	KAPOOR <i>et al.</i>, 2004
PfENR recombinante	66,3 kDa (432 aa) PI = 7,79	41,0 kDa (360 aa) PI = 8,86
Metodologias	Espectrofotometria Espectrofluorimetria	SPR
Tampão utilizado no ensaio cinético	Fosfato de sódio 100 mM, pH 7,5	Hepes 10 mM, pH 7,4; NaCl 150 mM; 3,4 mM EDTA
Temperatura da realização dos ensaios	25°C	20°C
Tempo de reação (ligação)	60 s	600 s.

Fonte: KAPOR *et al.*, 2004. Elaboração da autora.

Desta forma, por tudo o que foi exposto, nenhum mecanismo está totalmente comprovado. Na melhor das hipóteses o que se pode afirmar é que, considerando os dados atuais, o mecanismo mais provável para PfENR é o deslocamento duplo. São necessários mais esforços para fornecer suporte ou para o mecanismo de deslocamento duplo ou para qualquer outro que possa oferecer uma melhor descrição dos resultados experimentais. Dentro deste contexto, experimentos de

microcalorimetria podem ser realizados com o intuito de esclarecer em definitivo os mecanismo de ação da PfENR.

5.3 – Mecanismo da inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II⁻

Foi anteriormente demonstrado por OLIVEIRA e colaboradores (2004) que o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II (**Figura 10**), análogo da isoniazida, é um inibidor de ligação lenta para MtnhA do tipo selvagem e do tipo resistente à isoniazida (OLIVEIRA *et al.*, 2004 e 2006; VASCONCELOS *et al.*, 2008). Estes estudos indicaram que o modo de ação do composto pentaciano (isoniazida) ferrato II não requeria a ativação pela KatG, não necessitava da presença do NADH e também mostrava-se efetivo contra as cepas mutantes INH-resistentes.

A maioria dos estudos realizados com inibidores reversíveis, análogos do substrato, é desenvolvida sob condições do estado estacionário, nas quais a concentração da enzima é muito menor do que a concentração do inibidor (e substrato) e na qual todas as situações de equilíbrio envolvendo a enzima e os reatantes se desenvolvem rapidamente (MORRISON, 1982).

Contudo, há compostos que inibem reações catalisadas por enzimas, em concentração comparável à da enzima, e sob as condições nas quais o equilíbrio é alcançado rapidamente. Estes compostos são inibidores de ação lenta, para os quais a inclinação do gráfico do duplo-recíproco não varia como uma função linear da concentração total do inibidor (Ibid.). A inibição do tipo lenta será observada sempre que se forme um complexo enzima-inibidor a uma velocidade que seja mais lenta, relativamente à velocidade da reação global (ibid.). Os resultados deste tipo de experimento são analisados em termos de um mecanismo de inibição em duas

etapas, no qual a ligação inicial rápida do inibidor à enzima é seguida por um segundo passo lento que resulta na formação do complexo enzima-inibidor final (RAWAT *et al.*, 2003).

No presente estudo, após o reconhecimento de que a inibição da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II é tempo-dependente (**Figura 23**), experimentos de inibição lenta (*slow-onset inhibition*) foram realizados, na presença de várias concentrações do inibidor, na tentativa de elucidar o mecanismo de inibição desta enzima. Os perfis das curvas obtidas com os experimentos de *slow-onset inhibition* indicaram que o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II é um inibidor de ação inicial lenta contra a PfENR (**Figura 24**).

Três mecanismos básicos de inibição lenta foram descritos por Morrison & Walsh (1988) e estão representados na **Figura 27**. No mecanismo A (**Figura 27**), presume-se que a inativação tempo-dependente da enzima observada é resultante de uma interação bimolecular enzima-inibidor lenta, porque a concentração do inibidor é baixa e/ou devido a barreiras que o inibidor encontre em sua ligação ao sítio ativo da enzima. Para o mecanismo A, é esperado que ocorra uma relação linear entre a concentração do inibidor *versus* o valor de k_{obs} (MORRISON & WALSH, 1988)

No mecanismo B (**Figura 27**), presume-se que exista uma interação inicial rápida enzima-inibidor para formar EI, que então sofre uma isomerização lenta (alteração conformacional) para o estado E* (MORRISON, 1982). Para inibidores que atuem em conformidade com este mecanismo, a constante de dissociação global (K_i^*) deve ser inferior a constante de dissociação para o complexo inicialmente formado EI (K_i), condição esta que pode ser satisfeita somente quando

$k_6 < k_5$ ($K_i^* = K_i k_6 / (k_5 + k_6)$) e quando k_5 e k_6 são mais lentos do que todas as outras etapas (MORRISON & WALSH, 1988).

De acordo com o mecanismo B, na presença de uma concentração fixa do substrato (A), o valor de k_{obs} aumenta hiperbolicamente como uma função da concentração do inibidor com valores limites de k_6 e $k_5 + k_6$ em, respectivamente, zero e infinito da concentração do inibidor. Conforme descrito na seção Material e Métodos, k_{obs} na equação (6) representa a constante de velocidade aparente de primeira ordem para o estabelecimento do equilíbrio entre os complexos EI e EI* (a constante de velocidade observada para a formação de EI* ou a constante de velocidade de isomerização aparente).

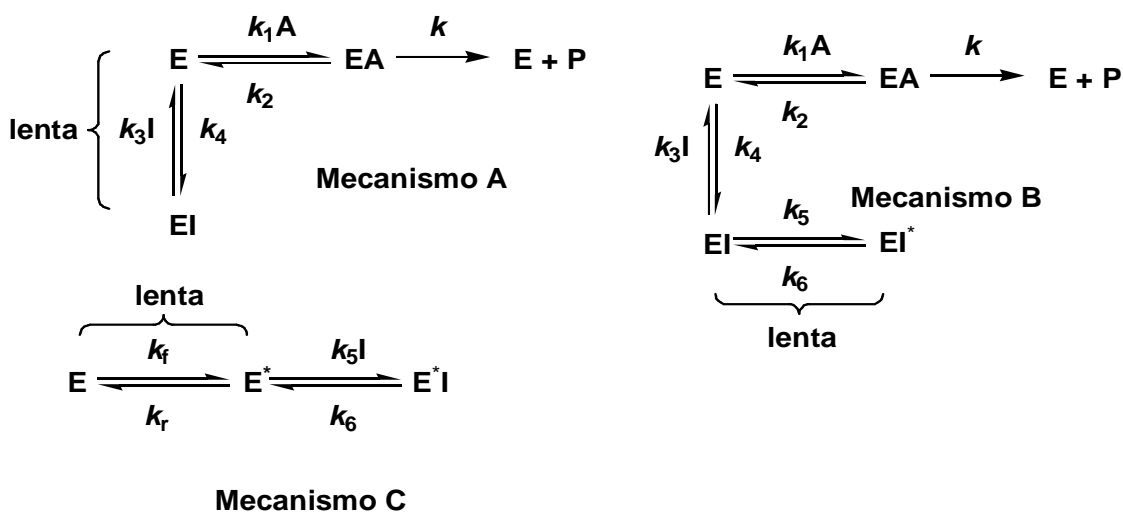


Figura 27. Mecanismos que descrevem a inibição de ligação lenta reversível de reações catalisadas por enzimas
Fonte: Morrison, 1982.

O mecanismo C (**Figura 27**), por sua vez, presume a ocorrência de uma isomerização inicial lenta das duas formas da enzima livre em solução (E e E*), seguida por uma rápida ligação do inibidor para formar o complexo E*I. Os valores k_f e k_r , correspondem, respectivamente, às constantes de velocidade para a frente e reversa da conversão da enzima livre (E) a uma forma de enzima livre (E*) na qual o inibidor se liga. De acordo com o mecanismo C, na presença de uma concentração fixa do substrato (A), o valor de k_{obs} decresce hiperbolicamente como uma função da concentração do inibidor

Neste estudo, ao se fixar os valores de k_{obs} em função da concentração do inibidor foi obtida uma curva que não permitiu concluir de forma exata qual o mecanismo da reação. Por outro lado, fixando-se os valores da velocidade inicial (v_0) em função da concentração do inibidor e utilizando-se a equação (7), obteve-se um valor de $40 (\pm 11) \mu\text{M}$ para K_i^{app} . Desta forma, um valor "verdadeiro", de $11 \mu\text{M} (\pm 3)$ para a constante de dissociação aparente K_i , referente ao complexo binário inicial enzima-inibidor (EI) foi calculado empregando-se a equação (8).

O mecanismo de inibição em duas etapas da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II foi avaliado por um experimento no qual a enzima foi inicialmente pré-incubada na presença de várias concentrações do inibidor. Os resultados foram analisados em termos de um mecanismo de inibição em duas etapas, no qual a ligação inicial rápida do inibidor à enzima é seguida por um segundo passo lento, que resulta no complexo enzima-inibidor final (**Figura 27**). Como o valor do K_i é muito maior do que K_i^* e a concentração do inibidor na solução do ensaio é inferior ao valor do K_i ($[I] < K_i$), além da existência de um excesso de substratos competitivos, NADH e Crotonoil-CoA, sobre o composto pentaciano

(isoniazida) ferrato II, a concentração de EI na solução de ensaio no estado estacionário é cineticamente insignificante (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Uma curva dos valores de k_{inat} versus concentração do inibidor demonstrou que os valores de k_{inat} aumentam hiperbolicamente em função da concentração do inibidor (**Figura 25**), o que é consistente com o mecanismo B (**Figura 27**), e coincidente com o resultado para o mesmo experimento realizado com a MtlhA (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os dados obtidos foram inseridos na equação (9), que descreve a inibição lenta para o mecanismo B, e gerou os seguintes valores: $K_i = 58 (\pm 12) \mu\text{M}$; $K_5 = 53 (\pm 2) \text{s}^{-1}$; $K_6 = 4 (\pm 2) \text{s}^{-1}$ e o valor calculado ($K_i^* = K_i K_6 / (K_5 + K_6)$) para a constante de inibição global = $4 \mu\text{M}$

Em estudos anteriores de mecanismos de inibição em duas etapas, referentes à inibição da MtlhA pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II foram produzidos os valores de $73 (\pm 14) \mu\text{M}$ para K_i , e de $0,51 (\pm 0,03) \text{min}^{-1}$ para K_5 . Em estudos de dissociação do mesmo composto, foram gerados os valores de $K_6 = 1,1 \times 10^{-3} \text{min}^{-1}$ e $K_i^* = 70 \text{nM}$ (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O mecanismo de duas etapas seguidos de inativação da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II envolve uma etapa de isomerização enzima-inibidor. A isomerização da enzima poderia envolver, por exemplo, uma mudança conformacional da proteína ou uma alteração da estrutura da água no sítio ativo da mesma. Para o inibidor, a mudança poderia ser a hidratação/desidratação de uma carbonila, uma alteração no estado de ionização, ou uma mudança conformacional. Estas alterações poderão ocorrer no complexo enzima-inibidor ou na solução (SCHLOSS, 1998).

Em se tratando de estudos realizados com alvos enzimáticos, o ponto frágil na utilização de inibidores clássicos como medicamentos para condições clínicas é

que a inibição resulta na acumulação do substrato para a enzima, fato que pode superar a inibição (BASSO *et al.*, 2010). Ao contrário, no processo de inibição ideal, a acumulação de substrato não deve ter qualquer efeito sobre a isomerização do complexo enzima-inibidor, comportamento típico do mecanismo de ação lenta que evita a reversão da inibição (MORRISON & WALSH, 1988). Além disso, o valor baixo da meia-vida para o passo limitante referente à dissociação do complexo binário é uma característica desejável, uma vez que pode ser esperado para melhorar a eficácia do inibidor (SCHLOSS, 1998). Recentemente, foi proposto por cientistas da GlaxoSmithKline (EUA) que a medida da meia-vida da dissociação é uma aferição fundamental para a otimização de compostos, revelando-se um indicador-chave da duração *in vivo* da eficácia e da seletividade do alvo (TUMMINO & COPELAND, 2008).

Compostos quimioterápicos à base de metais têm sido investigados para uso no tratamento de doenças tropicais como a malária, a tripanossomíase e a leishmaniose (SANCHEZ-DELGADO & ANZELLOTTI, 2004). Um exemplo bem sucedido de antimalárico à base de metal são os derivados da cloroquina (CQ). Testes *in vitro* e *in vivo* da CQ complexada a metais de transição (Rh, Ru) contra *Plasmodium berghei* mostraram que a incorporação de fragmentos de metal, em geral, produz uma melhoria da eficácia da cloroquina (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 1996). Mais recentemente, foi relatado que complexos de cloroquina e ouro apresentaram atividade contra cepas CQ-resistentes e sensíveis de *Plasmodium falciparum* (NAVARRO *et al.*, 1997; NAVARRO *et al.*, 2004). A maior atividade para esta série foi obtida pelo complexo [(CQ) Au (PPh₃)] [PF₆], que mostrou ser 9 vezes mais ativo do que o difosfato de cloroquina contra a cepa resistente CQ-FcB1 de *P. falciparum*, 5 vezes mais ativo contra a cepa FcB2 de *P. falciparum*, e 22 vezes mais

ativo contra o *P. berghei*, causador da malária em roedores (SANCHEZ-DELGADO & ANZELLOTTI, 2004).

No campo da descoberta e do desenvolvimento de novos medicamentos para a terapêutica da Malária, a busca de inibidores para a enzima 2-*trans*-enoil-ACP-redutase destaca-se como alvo promissor, principalmente pelo fato de não estar presente no homem e ser de vital importância para o Plasmodio. O composto pentaciano (isoniazida) ferrato II surgiu inicialmente neste cenário como produto de desenho racional de um análogo da isoniazida, idealizado principalmente para apresentar atividade contra a ENR das cepas de *M. tuberculosis* INH-resistentes, de forma independente de ativação pela proteína KatG (SOUZA *et al.*, 2005). De fato, este composto correspondeu não somente às expectativas iniciais de seus idealizadores, como também apresentou ação inibitória da atividade enzimática da ENR de *P. falciparum*, como ficou demonstrado no presente estudo.

Recentemente, foi demonstrado que o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II apresenta um perfil promissor em ensaios toxicológicos e que é passível de ser produzido em larga escala (BASSO *et al.*, 2010). Estas características juntas indicam que o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II é um candidato viável para estudos adicionais (incluindo eficácia *in vivo*) e que pode representar um protótipo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para tratamento tanto da tuberculose quanto da malária.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo buscou realizar a caracterização dos parâmetros cinéticos da PfENR, bem como a verificação *in vitro* da existência de inibição da atividade da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II, um análogo da isoniazida. Ao final do estudo foram alcançados os seguintes resultados:

- ✓ Expressão e purificação da PfENR recombinante fusionada a uma cauda de histidina. A proteína PfENR obtida nesta etapa apresentou atividade, confirmada em ensaios de cinética enzimática *in vitro*;
- ✓ Determinação da velocidade inicial e dos parâmetros cinéticos verdadeiros em estado estacionário da PfENR: $V_{\text{máx}} = 5,8 (\pm 0,3) \text{ U mg}^{-1}$; $k_{\text{cat}} = 6,2 (\pm 0,4) \text{ s}^{-1}$; $K_{\text{NADH}} = 85 (\pm 9) \mu\text{M}$; $K_{\text{Crotonoil-CoA}} = 63 (\pm 6) \mu\text{M}$; $k_{\text{cat}}/K_{\text{NADH}} = 7,3 (\pm 0,9) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; e $k_{\text{cat}}/K_{\text{Crotonoil-CoA}} = 9,8 (\pm 1,1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.
- ✓ Determinação da constante de dissociação global do NADH em equilíbrio: $K_{\text{d}} = 398 (\pm 53) \mu\text{M}$; através de medidas espectrofluorimétricas da formação do complexo binário PfENR:NADH;
- ✓ Determinação da constante de dissociação média do Butiril-CoA em equilíbrio: $K = 1.151 (\pm 638) \mu\text{M}$ através de medidas espectrofluorimétricas da formação do complexo binário PfENR:Butiril-CoA;
- ✓ Determinação da constante de velocidade aparente de primeira ordem referente à conversão $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$, por cinética em estado pré-estacionário (*stopped-flow*): $k_{\text{obs}} = 1.100 (\pm 29) \text{ s}^{-1}$;
- ✓ Proposição do mecanismo de deslocamento duplo para a reação catalisada pela PfENR, tendo por base estudos realizados no estado estacionário, pré-estacionário, e em equilíbrio de ligação;

- ✓ Determinação de que o composto pentaciano (isoniazida) ferrato II desenvolve uma inibição lenta (*slow-onset inhibition*) da atividade enzimática de PfENR;
- ✓ Determinação da constante de dissociação global $K_i^* = 4 \mu\text{M}$, referente ao complexo binário PfENR: pentaciano (isoniazida) ferrato II; e dos valores $K_i = 58 (\pm 12) \mu\text{M}$; $K_5 = 53 (\pm 2) \text{ s}^{-1}$ e $K_6 = 4 (\pm 2) \text{ s}^{-1}$;
- ✓ Proposição do mecanismo de inibição em duas etapas da PfENR pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II, o qual presume a ocorrência de uma etapa de isomerização enzima-inibidor.

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo propõe-se a trazer uma contribuição significativa para o entendimento sobre o mecanismo de ação da enzima PfENR, bem como iniciar uma etapa importante de estudos de inibição desta enzima pelo composto pentaciano (isoniazida) ferrato II.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, C. H.; PASQUALOTO, K. F. M.; ZAIM, M. H.; FERREIRA, E. I. **Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do *M. tuberculosis***. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.44(2): 167- 179; 2008.

BACA, A.M. & WIM, G.J.H. **Overcoming codon bias: A method for high-level overexpression of *Plasmodium* and other AT-rich parasite genes in *Escherichia coli***. International Journal for Parasitology, v.30: 113- 118; 2000.

BAIRD, J.K. & RIECKMANN, K.H. **Can primaquine therapy for vivax malaria be improved?** Trends in Parasitology, v.19(13): 115- 120; 2003.

BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUEMARD, A.; BALASUBRAMANIAN, V.; UM, K.S.; WILSON, T.; COLLINS, D.; DE LISLE, G.; JACOBS, W.R.JR. **InhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis***. Science, v.263: 227- 230: 1994.

BASSO, L.A.; ENGEL, P.C; WALMSLEY, A.R. **The mechanism of substrate and coenzyme binding to clostridial glutamate dehydrogenase during reductive amination**. Eur. J. Biochem, 234: 603- 615; 1995.

_____; SILVA, L.H.P.; FETT-NETO, A.G.; JUNIOR, W.F.A.; MOREIRA, I.S.; PALMA, M.S.; CALIXTO, J.B.; FILHO, S.A.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; SANTOS, D.S. **The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – A Review**. Mem. Inst. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100(6): 575- 606; 2005.

_____; SCHNEIDER, C.Z.; SANTOS, A.J.A.B.; SANTOS, A.A.; CAMPOS, M.M.; SOUTO, A.A.; SANTOS, D.S. **An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis**. J. Braz. Chem. Soc., v. 21: 1384- 1389; 2010.

BJORKMAN, A. & PHILLIPS-HOWARD, P.A. **The epidemiology of drug-resistant malaria**. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.84(2): 177– 180; 1990.

BLOLAND, P. **Drug resistance in malaria**. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.4. Geneva: World Health Organization; 2001.

BOLCHOZ, L.J.; BUDINSKY, R.A.; MCMILLAN, D.C.; JOLLOW, D.J. **Primaquine-induced hemolytic anemia: formation and hemotoxicity of the arylhydroxylamine metabolite 6-methoxy-8-hydroxylaminoquinoline**. Journal of Pharm. Exp. Ther., v.297(2): 509- 515; 2001.

BRADFORD, M.M.; McRORIE, R.A.; WILLIAMS, W.L. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v.72: 248– 254; 1976.

BRANDS, S.J. (org.). **Systema Naturae 2000.** Amsterdam, The Netherlands; 2009. Disponível em: <<http://www.taxonomy.nl/main/classification/1326.htm>>. Acesso realizado em: 08 nov. 2010.

BROCKMAN, A. PRICE, R.N.; VAN VUGT, M.; HEPPNER, D.G; WALSH, D.; SOOKTO, P.; WIMONWATTRAWATEE, T.; LOOAREESUWAN, S.; WHITE, N.J.; NOSTEN, F. ***Plasmodium falciparum* antimalarial drug susceptibility on the north-western border of Thailand during five years of extensive use of artesunate-mefloquine.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 94(5): 537- 544; 2000.

CARBALLEIRA, N.M. **New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents.** *Prog. Lipid. Res.*, v. 47(1): 50– 61; 2008.

CAMARGO, E.P. **A malária encenada no grande teatro social.** *Estudos Avançados, São Paulo*, v.9(24): 211- 228; 1995.

_____. **Malária, maleita, paludismo.** *Ciência e Cultura, São Paulo*, v.55(1): 26-29; 2003.

CARTER, R. & MENDIS, K.N. **Evolutionary and historical aspects of the burden of Malaria.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.15(4): 564– 594; 2002.

CHOUCHANE, S., GIROTTO, S., YU, S; MAGLIOZZO, R.S. **Identification and characterization of tyrosyl radical formation in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG).** *J. Biol. Chem.*, v.277: 42633- 42638; 2002.

CINQUIN, O.; CHRISTOPHERSON, R.I.; MENZ, R.I. **A hybrid plasmid for expression of toxic malarial proteins in *Escherichia coli*.** *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.117: 245– 247; 2001.

COURA J.R, SUÁREZ-MUTIS M, LADEIA-ANDRADE S. **A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection – A review.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.101(3): 229-237; 2006.

COWMAN, A.F.; MORRY, M.J.; BIGGS, B.A.; CROSS, G.A. FOOTE, S.J. **Amino acid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.85(23): 9109- 9113; 1988.

COX-SINGH, J.; DAVIS, T.M.; LEE, K.S.; SHAMSUL, S.S.; MATUSOP, A.; RATNAM, S.; RAHMAN, H.A.; CONWAY, D.J.; SINGH, B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening.** *Clinical Infectious Diseases*, v.46:165– 171; 2008.

DEANE, L.M. **Malaria studies and control in Brazil**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.38(2): 223- 230; 1988.

DeBARBER, A.E.; MDLULI, K.; BOSMAN, M.; BEKKER, L.G.; BARRY, C.E. **3rd Ethionamide activation and sensitivity in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v.97(17): 9677- 9682; 2000.

DELFINO, R.T.; SANTOS-FILHO, O.A.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. **Molecular modeling of wild type and antifolate resistant mutant *P. falciparum* DHFR**. Biophys. Chem., v.98: 287– 300; 2002.

EGAN, T.J.; & MARQUES, H.M. **The role of haem in the activity of chloroquine and related antimalarial drugs**. Coord. Chem. Rev., v.190-192: 493- 517; 1999.

FAWCETT, T.; COPSE, C.L.; SIMON, J.W.; SLABAS, A.R. **Kinetic mechanism of NADH-enoyl-ACP reductase from *Brassica napus***. FEBS Lett., v.484(2): 65- 68; 2000.

FERNANDES, N.E.P.; CRAVO, P.; ROSÁRIO, V.E. **Resistência à sulfadoxina-pirimetamina em Maputo, Moçambique: presença de mutações nos genes *dhfr* e *dhps* do *Plasmodium falciparum***. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.40(4):447- 450; 2007.

FERREIRA, A.W., ÁVILA, S.L.M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes**. 2 ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. p. 41; 2001.

FIDOCK, D.A.; NOMURA, T.; TALLEY, A.K.; COOPER, R.A.; DZEKUNOV, S.M.; FERDIG, M.T.; URSOS, L.M.; SIDHU, A.B.S.; DEITSCH, K.; SU, X-Z.; WOOTTON, J.C.; ROEPE, P.; WELLEMS, T.E. **Mutations in the *P. falciparum* digestive vacuole transmembrane protein PfCRT and evidence for their role in chloroquine resistance**. Mol. Cell, v.6: 861- 871; 2000.

FRANÇA, T.C.C.; MEDEIROS, A. L.; SANTOS FILHO, O.A.; SANTOS, E.C.P.; FIGUEROA-VILLAR, J.D.J. **A Complete Model of the *Plasmodium falciparum* Bifunctional Enzyme Dihydrofolate Reductase-Thymidylate Synthase. A Model to Design New Antimalarials**. Braz. Chem. Soc, v.15: 450- 454 ; 2004.

_____; SANTOS, M.G.; FIGUEROA-VILLAR, J.D. **Malária: aspectos históricos e quimioterapia**. Química Nova, v.31(5): 1271- 1278; 2008.

GARDNER, M.J., HALL, N., FUNG, E., WHITE, O., BERRIMAN, M., HYMAN, R.W., CARLTON, J.M.; PAIN, A.; NELSON, K.E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I.T.; JAMES, K.; EISEN, J.A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S.L.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M.S.; NENE, V.; SHALLOM, S.J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M.W.; VAIDYA, A.B.; MARTIN, D.M.; FAIRLAMB, A.H.; FRAUNHOLZ, M.J.; ROOS, D.S.; RALPH, S.A.; MCFADDEN, G.I.; CUMMINGS, L.M.; SUBRAMANIAN, G.M.; MUNGALL, C.; VENTER, J.C.; CARUCCI, D.J; HOFFMAN, S.L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R.W.; FRASER, C.M.; BARRELL, B. **Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum***. Nature, v.419(6906): 498– 511; 2002.

GORISCH, H. **Steady-state investigation of the mechanism of histidinol dehydrogenase.** Biochem. J., v.181: 153- 157; 1979.

GORNICKI, P. **Apicoplast fatty acid biosynthesis as a target for medical intervention in apicomplexan parasites.** Int. J. Parasitology, v.33: 885– 896; 2003.

GREGSON, A. & PLOWE, C.V. **Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates.** Pharmacological Reviews, v.57(1): 117- 145; 2005.

GUSTAFSSON, C.; GOVINDARAJAN, S.; MINSHUL, J. **Codon bias and heterologous protein expression.** Trends Biotechnol., v.22(7): 346- 353; 2004.

HASTINGS, I.A.; DONNELLY, M.J. **The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance.** Drug Resistance Updates, v.8(1): 43- 50; 2005.

HEATH, R.J.; WHITE, S.W.; ROCK, C.O. **Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents.** Progress in Lipid Research, v. 40(6): 467- 497, 2001.

HEYM, B.; ALZARI, P.M.; HONORÉ, N.; COLE, S.T. **Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** Mol. Microbiol., v.15: 235- 245; 1995.

HILL, A.V. **The Combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide I.** Biochem. J., v.7: 471- 480; 1913.

HINES, V. & JOHNSTON, M. **Analysis of the kinetic mechanism of the bovine liver mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase.** Biochemistry, v.28: 1222-1226; 1989.

HIROMI, K. **Kinetics of Fast Enzyme Reactions: Theory and Practice.** Kodansha Ltd., p. 187- 253; 1979.

HYDE, J.E. **Mechanisms of resistance of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs.** Microbes and infection / Institut Pasteur, v.4(2): 165- 174; 2002.

JELINEK, T.; GROBUSCH, M.P.; LOSCHER, T.; **Patterns of *Plasmodium falciparum* drug resistance in nonimmune travellers to Africa.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v.20(4): 284– 86; 2001.

JOHNSSON, K. & SCHULTZ, P.G. **Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*.** J. Am. Chem. Soc., v.116: 7425- 7426; 1994.

_____; KING, D.S.; SCHULTZ, P.G. **Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis.** J. Am. Chem. Soc., v.117: 5009- 5010; 1995.

JONES, M.K.& GOOD, M.F. **Malaria parasites up close.** Nature Medicine, v.12: 170- 171; 2006.

KAPOOR, M.; DAR, M. J.; SUROLIA, A.; SUROLIA, N. **Kinetic determinants of the interaction of enoyl-ACP reductase from *Plasmodium falciparum* with its substrates and inhibitors.** Biochemical and Biophysical Research Communications, v.289: 832- 837; 2001.

_____; MUKHI, P.L.; SUROLIA, N.; SUGUNA, K; SUROLIA A. **Kinetic and structural analysis of the increased affinity of enoyl-ACP (acyl-carrier protein) reductase for triclosan in the presence of NAD⁺.** Biochem. J., v.381: 725- 733; 2004 (a).

_____; GOPALAKRISHNAPAI, J.; SUROLIA, N.; SUROLIA, A. **Mutational analysis of the triclosan-binding region of enoyl-ACP (acyl-carrier protein) reductase from *Plasmodium falciparum*.** Biochem. Journal, v.381: 735-741; 2004 (b).

KODER, R.L. & MILLER, A.F. **Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase.** Biochim. Biophys. Acta, v.1387: 395- 405; 1998.

KRISHNA, S. & WHITE, N.J. **Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine. Clinical implications.** Clinical Pharmacokinetics, v.30: 263- 299; 1996.

KUBLIN J.G.; DZINJALAMALA, F.K.; KAMWENDO, D.D.; MALKIN, E.M.; CORTESE, J.F.; MARTINO, L.M.; MUKADAM, R.A.; ROGERSON, S.J.; LESCANO, A.; MOLYNEUX, M.E.; WINSTANLEY, P.A.; CHIMPENI, P.; TAYLOR, T.E.; PLOWE, C.V. **Molecular markers for failure of sulfadoxine pyrimethamine and chlorproguanil-dapsone treatment of *Plasmodium falciparum* malaria.** Journal of Infectious Diseases, v.185: 380- 388; 2002.

KUO, M.R.; MORBIDONI, H.R.; ALLAND, D.; SNEDDON, S.F.; GOURLIE, B.B.; STAVESKI, M.M.; LEONARD, M.; GREGORY, J.S.; JANJIGIAN, A.D.; YEE, C.; KREISWIRTH, B.; IWAMOTO, H.; PEROZZO, R.; JACOBS, W.R.JR.; SACCHETTINI, J.C.; FIDOCK, D.A. **Targeting tuberculosis and malaria through inhibition of enoyl reductase: compound activity and structural data.** The Journal of Biological Chemistry, v.278(23): 20851– 20859; 2003.

LEI, B.; WEI, C.J.; TU, S.C. **Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of InhA inhibitor.** J. Biol. Chem., v.275: 2520- 2526; 2000.

LINEWEAVER, H. & BURK, D. **The determination of enzyme dissociation constants.** J. Am. Chem. Soc., v.56: 658- 666; 1934.

LIU, W.; ROGERS, C.J.; FISHER, A.J.; TONEY, M.D. **Aminophosphonate inhibitors of dialkylglycine decarboxylase: structural basis for slow binding inhibition.** Biochemistry, v.41: 12320- 12328; 2002.

LU, H. & TONGE, P.J. **Mechanism and inhibition of the FabV enoyl-ACP reductase from *Burkholderia mallei***. *Biochemistry*, v.49: 1281- 1289; 2010.

MAGLIOZZO, R.S. & MARCINKEVICIENE, J.A. **The role of Mn(II)-peroxidase activity of mycobacterial catalase-peroxidase in activation of the antibiotic isoniazid**. *J. Biol. Chem.*, v.272: 8867- 8870; 1997.

MARCINKEVICIENE, J.; JIANG, W.; KOPCHO, L.M.; LOCKE, G.; LUO, Y.; COPELAND, R.A. **Enoyl-ACP reductase (FabI) of *Haemophilus influenzae*: steady-state kinetic mechanism and inhibition by triclosan and hexachlorophene**. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.390(1):101- 108; 2001.

McFADDEN, G.I. & ROOS, D.S. **Apicomplexan plastids as drug targets**. *Trends in Microbiology*, v.7(8): 328– 333; 1999.

McLEOD, R.; MUENCH, S.P.; RAFFERTY, J.B.; KYLE, D.E.; MUI, E.J.; KIRISITS, M.J.; MACK, D.G.; ROBERTS, C.W.; SAMUEL, B.U.; LYONS, R.E.; DORRIS, M.; MILHOUS, W.K.; RICE, D.W. **Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of apicomplexan Fab I**. *Int. J. Parasitol.*, v.31, 109– 113; 2001.

MEDEIROS, P.S.M.; DUCATI, R.G.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; SILVA, L.H.P. **Enzyme mechanism and slow-onset inhibition of *Plasmodium falciparum* enoyl- acyl carrier protein reductase by an inorganic complex**. (Article in press). *Enzyme Research*, v 2011 (2011), Article ID 642758, 11 pages. Disponível em: <<http://www.sage-hindawi.com/journals/er/2011/642758>> Acesso realizado em 05 abr. 2011.

MÉNARD, R. **Medicine: Knockout malaria vaccine?** *Nature*, v.433: 113- 114; 2005.

MICHAELIS, L. & MENTEN, M.L. **Die kinetic der invertinwirkung**. *Biochem. Zeitschr*, v.49: 333- 369; 1913.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa nacional de prevenção e controle da malária – PNCM - Série C. Projetos, Programas e Relatórios**. Brasília: Ministério da Saúde; 2003. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/pncm.pdf>> Acesso realizado em: 13 jan. 2011.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. **A Malária no Brasil – Boletim Malária Nº 1- 2005- NUCOM**. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/be_malaria_01_2005.pdf>. Acesso realizado em: 13 jan. 2011.

_____. Coordenação Geral do Programa Nacional de Controle da Malária. **Malária no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_da_malaria_site_svs_28_12.pdf>. Acesso realizado em: 13 jan. 2011.

MORRISON, J.F. **The slow-binding and slow, tight-binding inhibition on enzyme-catalysed reactions.** Trends Biochem. Sci., v.9: 102- 105; 1982.

_____ & WALSH, C.T. **The behavior and significance of slowbinding enzyme inhibitors.** Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., v.61: 201- 301; 1988.

MYSZKA, D.G. **Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors.** Curr. Opin. Biotechnol., v. 8: 50– 57; 1997.

NAMBIAR, K. P.; STACKHOUSE, J.; PRESNELL, S. R.; BENNER, S. A. **Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein.** Science, v.223(4642): 1299– 1301; 1984.

NAVARRO, M.; PEREZ, H.; SANCHEZ-DELGADO, R.A. **Toward a novel metalbased chemotherapy against tropical diseases. 3. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of the new gold-chloroquine complex [Au(PPh₃)(CQ)]PF₆.** J. Med. Chem., v., 40: 1937- 9; 1997.

_____; VASQUEZ, F.; SANCHEZ-DELGADO, R.A.; PEREZ, H.; SINOU, V.; SCHREVEL, J. **Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 7. Synthesis and *in vitro* antimalarial activity of new gold-chloroquine complexes.** J. Med. Chem.,; v.47: 5204- 9; 2004.

NGUYEN, M.; QUEMARD, A.; MARRAKCHI, H.; BERNADOU, J; MEUNIER, B. **The nonenzymatic activation of isoniazid by MnIII-pyrophosphate in the presence of NADH produces the inhibition of the enoyl-ACP reductase InhA from *Mycobacterium tuberculosis*.** C. R. Acad. Sci. Paris, Série IIc, Chimie/Chemistry, v.4: 35- 40; 2001.

NUNES, M.S.; FERREIRA, M.U. **Diagnóstico e tratamento da malária: estado atual e perspectivas.** Diagnóstico & tratamento, v.10(1); 2005. Disponível em: <http://www.apm.org.br/fechado/rdt_materia.aspx?idMateria=373> Acesso realizado em: 20 jan. 2011.

OLIVEIRA, J.S.; SOUSA, E.H.; BASSO, L.A.; PALACI, M.; DIETZE, R.; SANTOS, D.S.; MOREIRA, I.S. **An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*.** Chem. Commun. (Camb.), v.3: 312- 313; 2004.

_____; DE SOUSA, E.H.; DE SOUZA, O.N.; MOREIRA, I.S.; SANTOS, D.S.; BASSO, L.A. **Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex.** Curr. Pharm. Des., v.12: 2409- 2424; 2006.

_____; PEREIRA, J.H.; CANDURI, F.; RODRIGUES, N.C.; DE SOUZA, O.N.; DE AZEVEDO JR.; W.F., BASSO; L.A., SANTOS, D.S.;. **Crystallographic and pre-steady-state kinetics studies on binding of NADH to wild-type and isoniazid-resistant enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*.** J. Mol. Biol., v. 359 (3): 646– 666; 2006 (a).

ORJIH, A.U.; RYERSE, J.S.; FITCH, C.D. **Hemoglobin catabolism and the killing of intraerythrocytic Plasmodium falciparum by chloroquine.** *Experientia*, v.50: 34– 39; 1994.

PARAPINI, S.; BASILICO, N.; MONDANI, M.; OLLIANO, P.; TARAMELLI, D.; MONTI, D. **Evidence that haem iron in the malaria parasite is not needed for the antimalarial effects of artemisinin.** *FEBS Letters*, v.575(1): 91- 94; 2004.

PAULI, I.; BELLOWS, M.; FLOUDAS, C.A.; AZEVEDO Jr., W.F. **Geração de uma nova classe de inibidores para a enzima purina nucleosídeo fosforilase humana.** X Salão de Iniciação Científica – PUCRS, 2009. Disponível em: <http://www.pucrs.br/orgaos/edipucrs/XSalaolC/Ciencias_Biologicas/Bioquimica/71441-IVANI_PAULI.pdf> Acesso realizado em 05 abr 2011.

PETERSON, D; WALLIKER, D; WELLEMS, T. **Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in falciparum malaria.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.85: 9114– 9118; 1988.

_____; DI SANTI, S.M.; POVOA, M.; CALVOSA, V.S.; ROSARIO, V.E.; WELLEMS, T.E. **Prevalence of dihydrofolate reductase Asn-108 mutation as the basis of pyrimethamine-resistant falciparum malaria in the Brazilian Amazon.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.45: 492- 497; 1991.

PEROZZO, R.; FIDOCK, D.A.; KUO, M.; SIDHU, A.S.; VALIYAVEETIL, J.T.; BITTMAN, R.; JACOBS, W.R.; FIDOCK, D.A.; SACCHETTINI, J.C. **Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl acyl carrier protein reductase.** *Journal Biological Chem.*, v.277(15): 13106– 13114; 2002.

PIDUGU, L. S., KAPOOR, M., SUROLIA, N., SUROLIA, A. & SUGUNA, K. **Structural basis for the variation in triclosan affinity to enoyl reductases.** *J. Mol. Biol.*, v.343:147–155; 2004.

PLOWE, C.V.; CORTESE, J.F.; DJIMDE, A.; NWANYANWU, O.C.; WATKINS, W.M.; WINSTANLEY, P.A.; ESTRADA-FRANCO, J.G.; MOLLINEDO, R.E.; AVILA, J.C.; CESPEDES, J.L.; CARTER, D.; DOUMBO, O.K. **Mutations in Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase and epidemiologic patterns of pyrimethamine-sulfadoxine use and resistance.** *Journal of Infectious Diseases*, v.176: 1590-1596; 1997.

PÓVOA, M.M.; WIRTZ, R.A.; LACERDA, R.N.L.; MILES, M.A; WARHURST, D. **Malaria vectors in the municipality of Serra do Navio, State of Amapa, Amazon.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96:179- 184; 2001.
RADLOFF, P.D.; PHILIPPS, J.; NKEYI, M.; HUTCHINSON, D.; KREMSNER, P.G. **Atovaquone and proguanil for Plasmodium falciparum malaria.** *Lancet*, v.347(9014): 1511- 1514; 1996.

RALPH, S.A.; VAN DOOREN, G.G.; WALLER, R.F.; CRAWFORD, M.J.; FRAUNHOLZ, M.J.; FOTH, B.J.; TONKIN, C.J.; ROOS, D.S.; MCFADDEN, G.I. **Tropical infectious diseases: metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast.** Nature Reviews Microbiology, v.2(3): 203– 216; 2004.

RAMASWAMY, S.V.; REICH, R.; DOU, S.J.; JASPERSE, L.; PAN, X.; WANGER, A.; QUITUGUA, T.; GRAVISS, E.A.. **Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*.** Antimicrob. Agents Chemother., v.47: 1241- 1250; 2003.

RAWAT, R.; WHITTY, A.; TONGE, P.J. **The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of InhA, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v.100: 13881-13886; 2003.

REED, M.B.; SALIBA, K.J.; CARUANA, S.R.; KIRK, K.; COWMAN, A.F. ***Pgh1* modulates sensitivity and resistance to multiple antimalarials in *Plasmodium falciparum*.** Nature, v.403(6772): 906– 909; 2000.

REY, LUÍS. **Parasitologia.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 356p.; 2001.

ROCK, C.O.; CRONAN, J.E. ***Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis.** Biochim. Biophys. Acta, v.1302(1): 1-16; 1996.

ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; SILVA, M.S.N.; RODRIGUES, V.S. **Tuberculose resistente: revisão molecular.** Rev. Saúde Pública, v.36 (4): 525-532; 2002.

ROZWARSKI, D.A.; GRANT, G.A.; BARTON, D.H.; JACOBS, W.R.JR.; SACCHETTINI, J.C. **Modification of the NADH of the isoniazid target (InhA) from *Mycobacterium tuberculosis*.** Science, v.279: 98-102; 1998.

SANCHEZ-DELGADO, R.A.; NAVARRO, M.; PEREZ, H., URBINA, J.A. **Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases. 2. Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of new ruthenium- and rhodium-chloroquine complexes.** J. Med. Chem., v.39: 1095- 1099; 1996.

_____; ANZELLOTTI, A. **Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: trypanosomiasis, malaria and leishmaniasis.** Mini Rev. Med. Chem., v. 4: 23- 30; 2004.

SANTOS, D.S.; VASCONCELOS, I.B.; MEYER, E.; SALES, F.A.M.; MOREIRA, I.S.; BASSO, L.A. **The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex.** Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry, v.7(1): 50- 62; 2008.

SCHLOSS, J.V. **Significance of slow-binding enzyme inhibition and its relationship to reaction-intermediate analogues.** Acc. Chem. Res., v.21: 348-353; 1988.

SEGEL, I.H. **Enzyme kinetics. Behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.** John Wiley and Sons, p. 346- 46; 1975.

SHANKS, G.D. **The rise and fall of mefloquine as an antimalarial drug in Southeast Asia.** Military Med., v.159: 275– 281; 1994.

SIDHU, A.B.; VERDIER-PINARD, D.; FIDOCK, D.A. **Chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* malaria parasites conferred by pfcr1 mutations.** Science, v.298(5591): 210- 213; 2002.

SILVA, L.H.P. & OLIVEIRA, V. E. G. **O desafio da malária: o caso brasileiro e o que se pode esperar dos progressos da era genômica.** Ciência & Saúde Coletiva, v.7(1): 49- 63; 2002.

SILVA, T.H.A.; OLIVEIRA, M.T.; SANTOS, H.F.; OLIVEIRA, A.B.; ALMEIDA, W.B. **Estudo de modelagem molecular de complexos ferriprotoporfirina-IX e quinolinocarbinolaminas antimaláricas: propostas de um farmacóforo.** Química Nova, v.28(2): 244- 249; 2005.

SILVEIRA, A.C. & REZENDE, D.F. **Avaliação da estratégia global de controle integrado da malária no Brasil.** Brasília: Organização Pan-Americana da Saúde, 120p; 2001.

SINNIS, P.; SIM, B.K. **Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*.** Trends Microbiol., v.5: 52- 58; 1997.

SIRAWARAPORN, W; YONGKIETTRAKUL, S; SIRAWARAPORN, R; YUTHAVONG, Y; SANTI, D.V. ***Plasmodium falciparum*: asparagine mutant at residue 108 of dihydrofolate reductase is an optimal antifolate-resistant single mutant.** Experimental Parasitology, v.87(3): 245- 252; 1997.

SMITH, H.J. & SIMONS, C. **Enzymes and Their Inhibition: Drug Development.** CRC Enzyme Inhibitors Series. CRC Press, p. 150; 2005.

SOUSA, E.H.S.; PONTES, D.L.; DIÓGENES, I.C.N.; LOPES, L.G.F.; OLIVEIRA, J.S.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S.; MOREIRA, I.S. **Electron transfer kinetics and mechanistic study of the thionicotinamide coordinated to the pentacyanoferrate(III)/(II) complexes: a model system for the *in vitro* activation of thioamides anti-tuberculosis drugs.** Journal of Inorganic Biochemistry, v.99: 368- 375; 2005.

STANLEY, C.; OAKS, J. R.; VIOLAINE, S.; MITCHELL, G. W.; CHARLES, C. J. -eds. **Malaria – obstacles and opportunities a report of the Committee for the Study on Malarial Prevention and Control: status review and alternative strategies.** Division of International Health, Institute of Medicine, National Academy Press: Washington D.C., 1991.

SUGIOKA, Y. & SUZUKI, M. **The chemical basis for the ferriprotoporphyrin IX-chloroquine complex induced lipid peroxidation.** *Biochim Biophys Acta*, v.1074: 19- 24, 1991.

SULLIVAN JR., D.J.; MATILE, H.; RIDLEY, R.G.; GOLDBERG, D.E. **A common mechanism for blockade of heme polymerization by antimalarial quinolines.** *J. Biol. Chem.*, v.273: 31103- 31107; 1998.

SUROLIA, N. & SUROLIA, A.; **Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*.** *Nature Medicine*, v.7(2): 167– 173; 2001.

TASDEMIR, D. **Type II fatty acid biosynthesis, a new approach in antimalarial natural product discovery.** *Phytochem Rev.*, v.5: 99-108; 2006.

TSAI, C.S., BURGETT, M.W.; REED, L.J. **Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. XX. A kinetic study of the pyruvate dehydrogenase complex from bovine kidney.** *J. Biol. Chem.*, v.248: 8348- 8352; 1973.

TUMMINO, P.J. & COPELAND, R.A. **Residence time of receptor-ligand complexes and its effect on biological function.** *Biochemistry*, v.47: 5481-5492; 2008.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. **Quimioterapia da malária - um século no desenvolvimento de antimaláricos.** *Química Nova*, v.099: 61- 73; 2005.

VAN AGTMAEL, M.; BOUCHAUD, O.; MALVY, D.; DELMONT, J.; DANIS, M.; BARETTE, S.; GRAS, C.; BERNARD, J.; TOUZE, J.E.; GATHMANN, I.; MULL, R. **The comparative efficacy and tolerability of CGP 56697 (artemether + lumefantrine) versus halofantrine in the treatment of uncomplicated falciparum malaria in travellers returning from the Tropics to The Netherlands and France.** *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.12(2):159- 169; 1999.

VASCONCELOS, I.B.; MEYER, E.; SALES, F.A.M.; MOREIRA, I.S.; BASSO, L.A.; SANTOS, D.S. **The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type 30 and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP(CoA) reductase enzymes by an inorganic complex.** *Anti-Infect. Agents Med. Chem.*, v.7: 50-62; 2008.

VASCONCELOS, K.F.; PLOWE, C.V.; FONTES, C.J.; KYLE, D.; WIRTH, D.F.; PEREIRA-DA-SILVA, L.H.; ZALIS, M.G. **Mutations in *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of isolates from the Amazon region of Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.95(5): 721– 728; 2000.

VIAL, G.J. & ANCELIN, M. L. **Malarial lipids. An overview.** *Subcell. Biochem.*, v.18: 259– 306; 1992.

VIAL, H.J., ELDIN, P., TIELENS, A.G.; VAN HELLEMOND, J.J. **Phospholipids in parasitic protozoa.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.126: 143- 154; 2003.

VIEIRA, P.P.; FERREIRA, M.U.; ALECRIM, M.G.; ALECRIM, W.D.; DA SILVA, L.H.; SIHUINCHA, M.M.; JOY D.A.; MU, J.; SU, X.Z.; ZALIS, M.G. ***pfcr* polymorphism and the spread of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* populations across the Amazon Basin.** J. Infect. Dis., v.190(2): 417- 424; 2004.

VIEIRA, V.M.M. & OHAYON, P. **Inovação em fármacos e medicamentos: estado-da-arte no Brasil e políticas de P&D.** Economia e Gestão, v.6(13); 2006. Disponível em: <<http://periodicos.pucminas.br/index.php/economiaegestao/article/view/26/23>>; acesso realizado em: 31 mar. 2011.

VYTHILINGAM, I .; TAN, C.H.; ASMAD, M.; CHAN, S.T.; LEE, K.S.; SINGH, B. **Natural transmission of *Plasmodium knowlesi* to humans by *Anopheles latens* in Sarawak, Malaysia.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v.100: 1087- 1088; 2006.

WALLER, R.F., KEELING, P. J., DONALD, R. G. K., STRIEPEN, B., HANDMAN, E., LANG-UNNASCH, N., COWMAN, A. F., BESRA, G. S., ROOS, D.S.; MCFADDEN, G. I. **Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 95: 12352– 12357; 1998.

_____; RALPH, S.A.; REED, M.B.; SU, V.; DOUGLAS, J.D.; MINNIKIN, D.E.; COWMAN, A.F.; BESRA, G.S.; MCFADDEN, G.I. **A type II pathway for fatty acid biosynthesis presents drug targets in *Plasmodium falciparum*.** Antimicrob. Agents Chemother., v.47: 297– 301; 2003.

WATKINS, W.M.; BRANDLING-BENNETT, A.D.; NEVILL, C.G.; CARTER, J.Y.; BORIGA, D.A.; HOWELLS, R.E.; KOECH, D. **Chlorproguanil/dapsone for the treatment of non-severe *Plasmodium falciparum* malaria in Kenya: a pilot study.** Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v.82(3): 398- 403; 1988.

WEBER, G. **Energetics of ligand binding to proteins.** Adv. Protein Chem., v.29: 1-8; 1975.

WEEKS, G. & WAKIL, S.J. **Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. 18. Preparation and general properties of the enoyl acyl carrier protein reductases from *Escherichia coli*.** J. Biol. Chem., v.243(6): 1180- 1189; 1968.

WERNSDORFER, W.H. & PAYNE, D. **The dynamics of drug resistance in *Plasmodium falciparum*.** Pharmacol. Ther., v.50(1): 95– 121; 1991.

_____. **Epidemiology of drug resistance in malaria.** Acta Trop., v.56(2-3): 143– 156; 1994.

WHO. **The use of antimalarial drugs.** Report of an informal consultation, 13–17 November 2001, Geneva, Switzerland. WHO/CDS/RBM/2001.33. Geneva: World Health Organization; 2001.

_____. **10 facts on malaria.** Geneva: World Health Organization; 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/index.html>>. Acesso realizado em: 04 out. 2010.

WIESNER, J.; ORTMANN, R.; JOMAA, H.; SCHLITZER, M. **New antimalarial drugs**. Angew. Chem. Int., v.42: 5274- 5293; 2003.

WILLIAMS, D.C. & CLARK, M.P. **Synthesis of atovaquone**. Tetrahedron Letters, v.39(42): 7629- 7632; 1998.

WILMING, M. & JOHNSON, K. **Spontaneous formation of the bioactive form of the tuberculosis drug isoniazid**. Angew. Chem. Int. Ed., v.38: 2588-2590; 1999.

WILSON, R.J.M. (IAIN). **Parasit plastids: approaching the endgame**. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc., 80(1): 129- 153; 2005.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A.L.; WERNSDORFER, W.H.; MESHNICK, S.R. **Epidemiology of drug-resistant malaria**. Lancet Infect. Dis., v.2: 209- 218; 2002.

WOODROW, C. J.; HAYNES, R. K.; KRISHNA, S. **Artemisinins**. Postgraduate Medical Journal, v. 81: 71- 78; 2004.

XU, H.; SULLIVAN, T.J.; SEKIGUCHI, J.; KIRIKAE, T.; OJIMA, I.; STRATTON, C.F.; MAO, W.; ROCK, F.L.; ALLEY, M.R.; JOHNSON, F.; WALKER, S.G.; TONGE, P.J. **Mechanism and inhibition of saFabI, the enoyl reductase from *Staphylococcus aureus***. Biochemistry, v.47: 4228- 4236; 2008.

YUVANIYAMA, J.; CHITNUMSUB, P.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; VANICHTANANKUL, J.; SIRAWARAPORN, W.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M.D.; YUTHAVONG, Y. **Insights into antifolate resistance from malarial DHFR-TS structures**. Nat. Struct. Biol., v.10(5): 357- 365; 2003.

ZALIS, M.G.; PANG, L.; SILVEIRA, M.S.; MILHOUS, W.K.; WIRTH, D.F. **Characterization of *Plasmodium falciparum* isolated from the Amazon region of Brazil: evidence for quinine resistance**. Am. J. Trop. Med. Hyg., 58(5): 630- 637; 1998.

Research Article

Enzyme Mechanism and Slow-Onset Inhibition of *Plasmodium falciparum* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase by an Inorganic Complex

Patricia Soares de Maria de Medeiros,¹ Rodrigo Gay Ducati,² Luiz Augusto Basso,²
Diógenes Santiago Santos,² and Luiz Hildebrando Pereira da Silva¹

¹Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais (IPEPATRO), Rua da Beira 7671, Rodovia BR364 km 3.5,
76812-245 Porto Velho, RO, Brazil

²Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS),
Avenida Ipiranga 6681/92-A, 90619-900 Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Luiz Augusto Basso, luiz.basso@pucrs.br and
Luiz Hildebrando Pereira da Silva, hildebrando.pereira@yahoo.com.br

Received 22 December 2010; Accepted 25 January 2011

Academic Editor: Qi-Zhuang Ye

Copyright © 2011 Patricia Soares de Maria de Medeiros et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Malaria continues to be a major cause of children's morbidity and mortality worldwide, causing nearly one million deaths annually. The human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, synthesizes fatty acids employing the Type II fatty acid biosynthesis system (FAS II), unlike humans that rely on the Type I (FAS I) pathway. The FAS II system elongates acyl fatty acid precursors of the cell membrane in *Plasmodium*. Enoyl reductase (ENR) enzyme is a member of the FAS II system. Here we present steady-state kinetics, pre-steady-state kinetics, and equilibrium fluorescence spectroscopy data that allowed proposal of *P. falciparum* ENR (PfENR) enzyme mechanism. Moreover, building on previous results, the present study also evaluates the PfENR inhibition by the pentacyano(isoniazid)ferrateII compound. This inorganic complex represents a new class of lead compounds for the development of antimalarial agents focused on the inhibition of PfENR.

1. Introduction

Malaria, a disease caused by a protozoan pathogen of the genus *Plasmodium*, remains one of the most devastating human diseases, causing as many as 250 million new cases and nearly one million deaths annually worldwide. This disease is especially worrisome in Africa, where one out of every five infant deaths is related to its effects [1]. Although malaria can be caused by mainly four species of the genus, *Plasmodium falciparum* is responsible for the most severe and deadly form of the disease and is to blame for 90% of malaria-related deaths occurring in African children below the age of five [2]. At present, the available drugs used to fight the disease are (a) aryl aminoalcohol compounds, such as quinine [3], (b) antifolates-dihydrofolate reductase

inhibitors, such as pyrimethamine [4, 5], or (c) artemisinin derivatives [6]. Therapeutic treatment has, however, encountered serious obstacles, as this parasite has developed at least partial resistance to nearly every antimalarial regimen introduced to date, including the first-line drugs chloroquine and sulfadoxine-pyrimethamine [7]. As single-drug treatments are no longer adequate, combinations of two or more drugs will probably offer improved efficacy and reduced risk of emergence of drug-resistant parasites. Current examples of drug combinations are artemisinin-amodiaquine and artemether-lumefantrine (Coartem) [8]. The lack of an effective prophylactic vaccine and the generation and dissemination of drug-resistant strains clearly indicate the need for the development of new therapeutic approaches and identification of novel targets.

P. falciparum, a malarial parasite of the phylum Apicomplexa, has been found to contain an apicoplast, an organelle that originally arose from a cyanobacterium through a secondary endosymbiotic process, and, thus, possesses four membranes. During these endosymbiotic processes, resultant of millions of years of adaptive selection, the endosymbiont and host were integrated in a relationship involving gene losses and gene transfers, resulting in a reduction of the apicoplast genome to a bare minimum [9]. The majority of the apicoplast proteins are encoded by genes in the nuclear genome of the host, and the proteins that reside in the apicoplast and are encoded by the nucleus are posttranslationally targeted to the apicoplast organelle via the secretory pathway, owing to the existence of a bipartite N-terminal leader sequence [10]. In fact, the apicoplast is indispensable for the malarial parasite, since several vital metabolic processes for the parasite occur in this organelle. Among these processes are isoprene, haem, and fatty acid biosynthesis [11]. Fatty acid biosynthesis is critical for the parasite development as fatty acids are the major components of cell membranes. Moreover, fatty acids are important source of energy, play a key role in signal transduction as well as in protein acylation, and are needed for the growth, differentiation, and homeostasis in *P. falciparum*. It is also known that lipid biosynthesis is highly increased during the erythrocytic phases, when the parasite grows and divides extremely fast [12]. As the parasite invades its host, it attempts to protect itself by creating a so-called parasitophorous vacuole, in part as a protection from the host's immune system [13]. In this process, the parasite needs to produce its own fatty acids *de novo* so as to form and expand its membrane [14].

The enzymes involved in the biosynthesis of fatty acids are organized in two distinct ways within living systems. Fungi, mammals, and some mycobacteria accomplish fatty acid synthesis through the action of multifunctional proteins, each reaction being catalysed by a distinct region (domain) of these single-polypeptide proteins. These enzymes are classified as Type I fatty acid synthases (FAS I) and are also described as the "associative" type of fatty acid synthases, as successive steps in the fatty acid synthetic reaction occur at specific domains [15, 16]. In contrast, plants and many bacteria use the Type II or "dissociated" fatty acid synthases (FAS II), whose enzymes are best characterized in *Escherichia coli* [17]. Each step of the FAS II system is catalysed by a specific enzyme encoded by a separate gene. Since the FAS II is absent in humans, it represents a great opportunity for therapeutic applications. The fatty acid chain elongation module of FAS II consists of the cycling of the growing fatty acyl moiety through four key enzymes. Elongation is initiated by β -ketoacyl-ACP synthase I/II (FabB/FabF) enzyme, which catalyses the condensation of the growing fatty acyl ACP with malonyl-ACP to yield a β -ketoacyl-ACP with an additional two-carbon unit. The second step is the reduction of β -ketoacyl-ACP to β -hydroxyacyl-ACP catalysed by the β -ketoacyl-ACP reductase (FabG) enzyme. Water is then removed by β -hydroxydecanoyl-ACP dehydratase/isomerase (FabA) and/or β -hydroxyacyl-ACP dehydratase (FabZ) to produce

2-*trans*-enoyl-ACP. The final step in the elongation process is the NADH-dependent reduction of the double bond to produce fatty acyl ACP, which is catalysed by FabI, the only enoyl-ACP reductase (ENR) enzyme in *Plasmodium* (Figure 1). Successive elongation cycles typically lead to the formation of decanoic (C-10), lauric (C-12), and myristic (C-14) acids as the major fatty acyl ACPs in *Plasmodium* [13], whereas palmitic (C-16) acid is the most predominant fatty acid synthesized in humans [12].

ENR from *Mycobacterium tuberculosis* (MtInhA) was first identified as being the primary target for isoniazid (INH; Figure 2(a)) [18], the most prescribed drug to treat active tuberculosis. The enzyme is an NADH-dependent enoyl-ACP reductase specific for long-chain enoyl thioester substrates. MtInhA is a member of the mycobacterial FAS II, which elongates acyl fatty acid precursors of mycolic acids. INH is a prodrug that is activated by the de mycobacterial *katG*-encoded catalase-peroxidase enzyme in the presence of manganese ions, NAD (H) and oxygen [19, 20]. Approximately 50% of *M. tuberculosis* INH-resistant clinical isolates harbor deletions of, or missense mutations in, the *katG* gene [21, 22]. The KatG-produced acetylpyridine fragment of INH is covalently attached to the C4 position of NADH and forms a binary complex with the wild-type MtInhA [23]. This isonicotinoyl-NAD⁺ adduct has been characterized spectroscopically and shown to bind to the enzyme with a dissociation constant value lower than 0.4 nM [24]. The isonicotinoyl-NAD⁺ adduct has been shown to be a slow, tight-binding competitive inhibitor of wild-type MtInhA [25]. The initial rapidly reversible weak binding ($K_i = 16$ nM) is followed by a slow isomerization, leading to a tighter enzyme-inhibitor complex with an overall dissociation constant (K_i^*) value of 0.75 nM.

The mechanism of action of INH requires its conversion, by the mycobacterial KatG, into a number of electrophilic intermediates [20]. The formation of the adduct has been proposed to be formed through the addition of either an isonicotinic acyl anion to NAD⁺ or an isonicotinic acyl radical to a NAD free radical [23]. The peroxidase activity of KatG catalyses the conversion of Mn²⁺ to Mn³⁺ [26]. Rapid freeze-quench electron paramagnetic resonance spectroscopy experiments have shown that hydrogen atom abstractions may be initiated by a KatG tyrosyl radical [27]. Furthermore, it has been shown that the yield of isonicotinoyl-NAD⁺ adduct is about the same after oxidation of INH by KatG or Mn³⁺ [28]. Accordingly, oxidation by Mn³⁺-pyrophosphate has been proposed as an alternative method for nonenzymatic INH activation for simple chemical synthesis of various INH derivatives that mimic the isonicotinoyl-NAD⁺ adduct [29]. Based on the activation mechanism proposed for INH, via an electron transfer reaction, an alternative self-activation inner-sphere electron transfer reaction route was proposed for designing new drugs for the treatment of INH-resistant and INH-sensitive tuberculosis. These drugs would be activated by electron transfer reactions before interacting with their cellular targets, and a redox reversible metal complex coordinated to the prodrug was employed as a prototype. Accordingly, we have recently demonstrated that pentacyano(isoniazid)ferrate(II) or

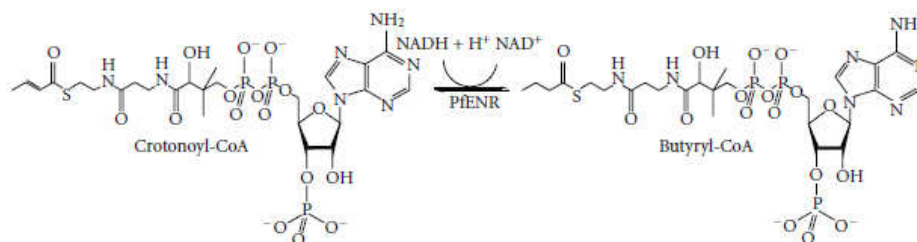


FIGURE 1: Reaction catalysed by PfENR.

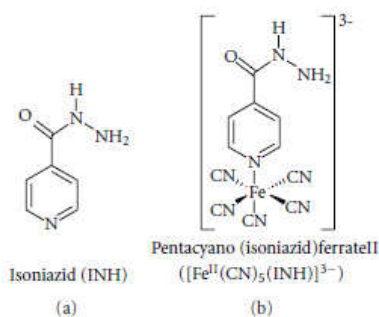


FIGURE 2: Chemical structure of isoniazid (a) and pentacyano(isoniazid)ferrateII (b).

$[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ (Figure 2(b)) inhibits the activity of both wild-type and I21V mutant (INH-resistant) MtInhA enzymes [30]. The *in vitro* kinetics of inactivation indicates that this process requires no activation by KatG, no need for the presence of NADH, and is also effective against INH-resistant InhA mutants. An MIC value of $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ for this inorganic complex was determined by the radiometric BACTEC AFB system for the *M. tuberculosis* H37Rv strain, and toxicity assays in HL60 leukemia and MCF-7 breast cancer cells yielded an IC_{50} value greater than $25 \mu\text{g mL}^{-1}$, thereby indicating a good selectivity index ($\text{SI} = \text{IC}_{50}/\text{MIC} > 125$; the Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility of USA suggests that in order to a compound move forward through screening programs, SI should be larger than 10). More recently, we have shown that the $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ complex is a slow-onset inhibitor of MtInhA enzyme activity, with a true overall dissociation constant value of 70 nM [31]. In this mechanism of action an initial enzyme-inhibitor complex is rapidly formed, which then undergoes a slow isomerization reaction of an enzyme-inhibitor binary complex, where the inhibitor is more tightly bound to enzymes. The weakness in the use of classical enzyme inhibitors as drugs for clinical conditions is that inhibition results in the upstream accumulation of the substrate for the enzyme, which may overcome the inhibition. By contrast, the build-up of substrate cannot have any effect on the isomerization of the enzyme-inhibitor

complex typical of the slow-onset mechanism and hence reversal of the inhibition [32].

The structural similarity between MtInhA and PfENR stimulated us to test the $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ against the malarial enzyme. This work investigates the efficacy of the $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ compound against PfENR. In addition, we propose an enzyme mechanism for PfENR based on steady-state kinetics, pre-steady-state kinetics, and fluorescence spectroscopy data.

2. Materials and Methods

2.1. Materials. All chemicals used were of analytical or reagent grade and required no further purification. Crotonoyl-CoA, NADH, and butyryl-CoA were from Sigma (Steinheim, Germany). PfENR (EC 1.3.1.9) was expressed and purified by Genscript Corp., New Jersey, USA. The $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ compound was a kind gift of Dr. Luiz G.F. Lopes and Dr. Eduardo H.S. Sousa from Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza, CE, Brazil. The steady-state activity assays were carried out in a UV-2550 UV-Visible Spectrophotometer, and fluorescence binding experiments were carried out in an RF-5301PC Spectrophotometer, both from Shimadzu (Kyoto, Japan).

All enzyme activity assays were performed under initial rate conditions at 25°C in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 in 500 μL total reaction volumes, and each individual initial rate datum was the average of duplicate or triplicate measurements. Crotonoyl-CoA, NADH, butyryl-CoA, $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$, and the enzyme were dissolved in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5. The reactions were monitored by the decrease in absorbance at 340 nm due to the conversion of NADH ($\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) to NAD⁺.

2.2. Initial Velocity. In order to determine the true steady-state kinetic parameters and initial velocity patterns, PfENR activity was measured in the presence of varying concentrations of crotonoyl-CoA (10–240 μM) and several fixed-varied NADH concentrations (20–200 μM), and reactions were initiated by the addition of 0.12 μM of PfENR into the reaction mixture.

2.3. Fluorescence Spectroscopy. Fluorescence titration was performed to assess the dissociation constant at equilibrium for binary complexes formed between PfENR and either substrate(s) or product(s) at 25°C. Crotonoyl-CoA, NADH, butyryl-CoA, and PfENR were dissolved in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5. Fluorescence titration with crotonoyl-CoA was carried out by making microliter additions of 0.5 mM and 5 mM crotonoyl-CoA stock solutions (0.50–425.97 μ M crotonoyl-CoA final concentrations) to 1 mL of 3 μ M PfENR, keeping the dilution to a maximum of 10.1%. Measurements of changes in intrinsic protein fluorescence of PfENR upon crotonoyl-CoA binding employed excitation wavelength at 305 nm, and the emission wavelengths ranged from 325 to 370 nm (maximum PfENR $\lambda_{EM} = 348$ nm); the slits for excitation and emission wavelengths were, respectively, 15 and 5 nm. Fluorescence titration with NADH was carried out by making microliter additions of 0.5 mM, 1 mM, and 5 mM NADH stock solutions (0.50–119.21 μ M NADH final concentrations) to 1 mL of 3 μ M PfENR, keeping the dilution to a maximum of 4.1%. Measurements of changes in NADH fluorescence upon binding to PfENR employed excitation wavelength at 360 nm, and the emission wavelengths ranged from 360 to 560 nm (maximum $\lambda_{EM} = 460$ nm); the slits for excitation and emission wavelengths were, respectively, 1.5 and 5 nm. Fluorescence titration with butyryl-CoA was carried out by making microliter additions of 0.5 mM, 2.5 mM, 5 mM, and 10 mM butyryl-CoA stock solutions (0.50–550.85 μ M butyryl-CoA final concentrations) to 1 mL of 3 μ M PfENR, keeping the dilution to a maximum of 8.4%. Measurements of changes in intrinsic protein fluorescence upon butyryl-CoA binding to PfENR employed excitation wavelength at 300 nm, and the emission wavelengths ranged from 320 to 400 nm (maximum PfENR $\lambda_{EM} = 337$ nm); the slits for excitation and emission wavelengths were, respectively, 5 and 10 nm. Control experiments were employed to both determine the maximum ligand concentrations to be used with no inner filter effect and determine dilution effects on protein fluorescence. No fluorescence titration with NAD⁺ could be performed due to a large inner filter on protein fluorescence.

2.4. Pre-Steady-State Kinetics. Pre-steady-state kinetic measurements of NADH \rightarrow NAD⁺ conversion by PfENR were carried out to confirm the proposed kinetic mechanism and assess whether the apparent rate constant for this conversion contributes to the rate-limiting step. The decrease in absorbance upon NADH conversion to NAD⁺ was monitored at 340 nm (1 mm slit width = 4.65 nm spectral band), at 25°C, using a split time base (0.2–2 s; 200 data points for each time base). The experimental conditions were 3.14 μ M PfENR and 200 μ M NADH in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5 (mixing chamber concentrations). The dead time of the stopped-flow equipment is 1.37 ms.

2.5. [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻ In Vitro Activity against PfENR. [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻ time-dependent inhibition of PfENR was performed since it had been observed in MtInhA [31].

The enzyme was preincubated with the inhibitor for 15 min (2.77 : 2455 μ M enzyme : inhibitor solution), and the activity was monitored by adding 0.12 : 54 μ M enzyme : inhibitor mixture aliquots, with different times of exposure, to the reaction mixtures which contained crotonoyl-CoA and NADH concentrations close to their K_M values. The reaction was monitored by following enzyme activity during the time course.

2.6. Slow-Binding Inhibition Kinetics of PfENR by [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻. Typical slow-binding experiments were carried out in the presence of various [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻ concentrations as an attempt to elucidate the kinetic mechanism of the time-dependent inhibition observed for PfENR. In the case of slow-binding inhibitors, the binding, which is comprised by the establishment of the equilibrium between enzyme, inhibitor, and enzyme-inhibitor complexes, occurs slowly in a time scale of seconds to minutes [32]. These experiments were conducted under conditions in which [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻ concentrations were significantly larger than enzyme concentration, and measurements were made within a time range over which there was no significant substrate depletion. The assay mixtures contained 80 μ M crotonoyl-CoA, 120 μ M NADH, 2% (vol/vol) glycerol, 49.7 μ g mL⁻¹ BSA, and 0–35 μ M [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻. The reactions were initiated by adding enzyme (0.69 nM) to the assay mixture and were monitored by following the decrease in NADH absorbance at 340 nm for 21600 s (6 hours). Enzyme activity was stabilized by the addition of glycerol and BSA to the reaction mixture as described for MtInhA [25, 31].

2.7. Two-Step Mechanism of PfENR Inhibition by [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻. The two-step mechanism observed for MtInhA inhibition by [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻ [31] was investigated for PfENR. The latter was preincubated in the presence of various concentrations of [Fe^{II}(CN)₅(INH)]³⁻, and the decrease of PfENR activity was assessed by withdrawing aliquots from the preincubation mixtures at appropriate intervals, followed by rapid measurement of initial velocity. Reactions of time-dependent inactivation of PfENR were carried out in mixtures containing 12 μ M PfENR and various concentrations of inhibitor. Control experiments were performed with no inhibitor. At various times, the residual enzyme activity was determined by diluting an aliquot (100-fold) of the reaction mixture into the assay solution, which contained 40 μ M crotonoyl-CoA and 50 μ M NADH.

2.8. Data Analysis. The kinetic parameter values and their respective standard errors were obtained by fitting the data to the appropriate equations by using the nonlinear regression function of SigmaPlot 2004 (SPSS, Inc.).

Apparently parallel family of lines of initial velocity data were tentatively fitted to (1), which describes a double displacement mechanism [33]. For (1), v is the measured reaction velocity, V is the maximal velocity, A and B are

the concentrations of the substrates (NADH and crotonoyl-CoA), and K_a and K_b are their respective Michaelis constants:

$$v = \frac{VAB}{K_a B + K_b A + AB} \quad (1)$$

Data from equilibrium fluorescence spectroscopy were fitted either to a hyperbolic function ((2); [34]) or to the Hill equation ((3); [35]). For (2) and (3), F is the observed fluorescence signal, F_{\max} is the maximal fluorescence, F/F_{\max} ratio represents the degree of saturation, A is the concentration of the ligand (either NADH or butyryl-CoA), n represents the total number of binding sites, K_d is the overall dissociation constant, and K' represents a mean dissociation constant for enzyme: ligand binary complex formation, which is comprised of interaction factors and the intrinsic dissociation constant [36, 37]:

$$\frac{F}{F_{\max}} = \frac{A}{K_d + A} \quad (2)$$

$$\frac{F}{F_{\max}} = \frac{A^n}{K' + A^n} \quad (3)$$

The equilibrium fluorescence data representing the fractional saturation (0.10–0.90) for the homotetrameric form [38] of PfENR were fitted to (4) (the Hill plot), in which Y is the fraction of substrate binding sites occupied by the substrate and h is the Hill coefficient:

$$\log\left(\frac{Y}{1-Y}\right) = h \log A - \log K' \quad (4)$$

The pre-steady-state time course of NADH \rightarrow NAD⁺ conversion was fitted to (5) for a single exponential decay, in which A is the absorbance at time t , A_0 is the absorbance at time zero, and k is the apparent first-order rate constant for product formation:

$$A = A_0 e^{-kt} \quad (5)$$

Apparent pseudofirst-order rate constants were calculated by fitting the progress curves for time-dependent inactivation of PfENR to integrated equation (5) for slow-binding inhibition [25, 32, 39]. For (6), A_t and A_0 are the 340-nm absorbances at time t and time 0, v_0 , v_s , and k_{obs} represent, respectively, the initial velocity, the final steady-state velocity, and the apparent first-order rate constant for the establishment of the equilibrium between EI and EI* complexes (the observed rate constant for formation of EI* or the apparent isomerization rate constant):

$$A_t = v_s t + \frac{(v_0 - v_s)(1 - e^{-k_{\text{obs}} t})}{k_{\text{obs}}} \quad (6)$$

An estimate of the apparent dissociation constant (K_i^{app}) was obtained by fitting the variation of initial rate (v_0) with inhibitor concentration (I) to (7) for competitive inhibition, in which $v_{0\text{max}}$ is the initial velocity in the absence of inhibitor [31]:

$$v_0 = \frac{v_{0\text{max}}}{1 + [I]/K_i^{\text{app}}} \quad (7)$$

A “true” value for the apparent dissociation constant K_i for the initial enzyme-inhibitor binary complex (EI) can be calculated by (8), in which K_{NADH} and $K_{\text{Crotonoyl-CoA}}$ are the values for the Michaelis-Menten constants and $[\text{NADH}]$ and $[\text{Crotonoyl-CoA}]$ are the concentration values used in the slow-onset inhibition assays:

$$K_i = \frac{K_i^{\text{app}}}{1 + [\text{NADH}]/K_{\text{NADH}} + [\text{Crotonoyl-CoA}]/K_{\text{Crotonoyl-CoA}}} \quad (8)$$

The data from two-step mechanism studies of PfENR inhibition by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ were fitted to (9), in which K_i is the dissociation constant for the initial enzyme-inhibitor binary complex (EI), k_5 is the forward isomerization rate constant for conversion of EI to EI*, k_6 is the reverse isomerization rate constant (conversion of EI* to EI), I is the concentration of inhibitor ($[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$), and k_{inact} is the apparent first-order constant for enzyme inhibition:

$$k_{\text{inact}} = k_6 + \frac{k_5 I}{K_i + I} \quad (9)$$

3. Results and Discussion

3.1. Initial Velocity Patterns and Kinetic Constants. Initial velocity patterns were determined using either crotonoyl-CoA or NADH as the variable substrate to distinguish between a sequential and a double displacement (“ping-pong”) mechanism, providing information regarding the order of substrate binding. Double-reciprocal plot [40] analysis revealed a parallel line pattern for both substrates (Figure 3), which is consistent with a double displacement mechanism. In this mechanism, a catalytic event can occur when only one of the two substrates is bound to the enzyme. A catalytic event occurs after the binding of substrate A to the enzyme (E), but prior to the binding of substrate B. After the first catalytic event, a portion of substrate A remains in the active site of the enzyme, whereas the other portion denoted as product P dissociates. The first catalytic event produces a different stable enzyme form (F) to which substrate B can bind and proceed with catalysis to generate product Q and regenerate free enzyme (E). The data were tentatively fitted to (1), yielding the following values for the true steady-state kinetic constants: $V_{\max} = 5.8 (\pm 0.3) \text{ U mg}^{-1}$, $k_{\text{cat}} = 6.2 (\pm 0.4) \text{ s}^{-1}$, $K_{\text{NADH}} = 85 (\pm 9) \mu\text{M}$, $K_{\text{Crotonoyl-CoA}} = 63 (\pm 6) \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}}/K_{\text{NADH}} = 7.3 (\pm 0.9) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and $k_{\text{cat}}/K_{\text{Crotonoyl-CoA}} = 9.8 (\pm 1.1) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

There are, however, some conditions where lines that seem parallel really are not. For an Ordered Bi Bi system in which the dissociation constant for substrate A (K_{ia}) is very much smaller than the Michaelis-Menten constant for A (K_a or K_{MA}), the family of reciprocal plots intersect far to the left of the $1/v$ axis and far below the $1/[A]$ axis [36]. In addition, seemingly parallel initial velocity patterns can also occur in rapid equilibrium random systems where the binding of one substrate strongly inhibits the binding of the other.

3.2. Equilibrium Binding of Ligands to PfENR. Equilibrium binary complex formation experiments were employed to

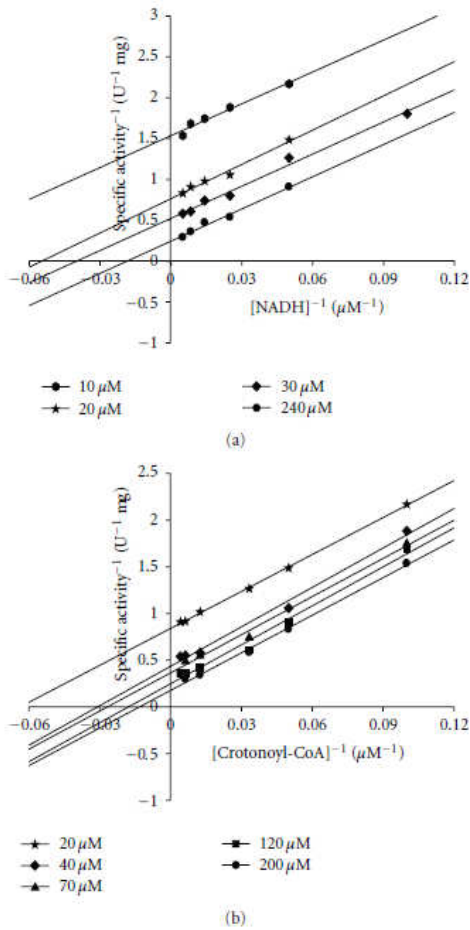


FIGURE 3: Intersecting initial velocity patterns for PfENR with either NADH (a) or crotonoyl-CoA (b) as the variable substrate. Each curve represents varied-fixed levels of the cosubstrate: one unit of enzyme activity (U) is defined as the amount of enzyme that catalyses the phosphorylation of $1 \mu\text{mol}$ of crotonoyl-CoA per minute in a 1 cm optical path.

confirm, or refute, the proposed enzyme mechanism. There was an enhancement in nucleotide fluorescence upon NADH binding to PfENR, whereas butyryl-CoA binding to PfENR resulted in intrinsic protein fluorescence quench. Titration of PfENR with NADH was hyperbolic (Figure 4(a)), and the data were fitted to (3) yielding a value of $398 (\pm 53) \mu\text{M}$ for the overall dissociation constant (K_d) of NADH. Enzyme titration with butyryl-CoA was sigmoidal (Figure 4(b)), and the data were best fitted to (4) yielding a value for K' for butyryl-CoA of $1151 (\pm 638) \mu\text{M}$. The value for K' represents a mean dissociation constant for PfENR:butyryl-CoA binary complex formation, which is comprised of interaction

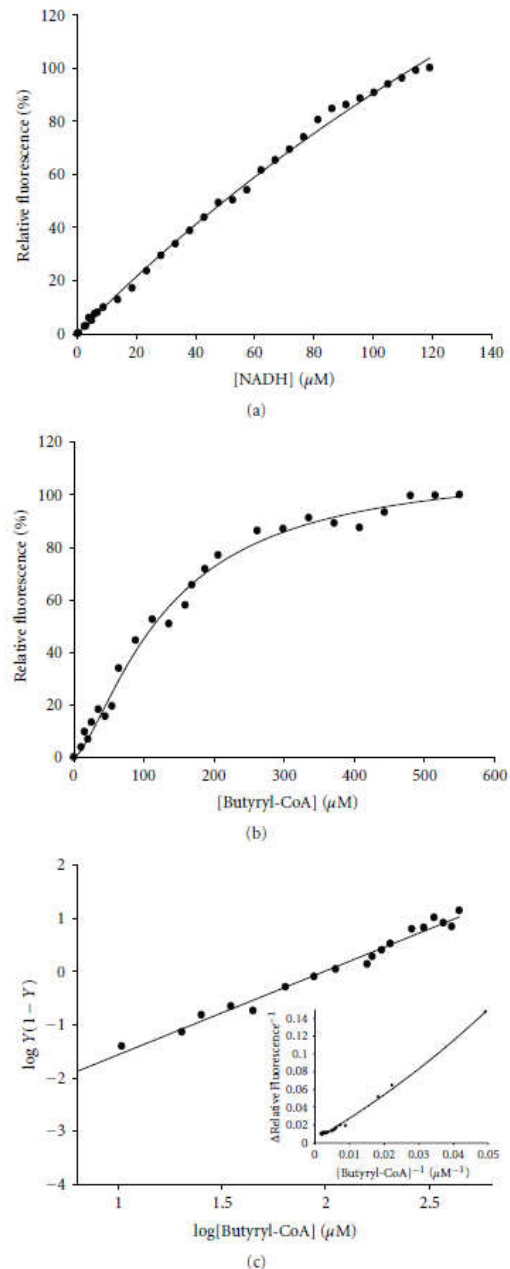


FIGURE 4: Overall dissociation constant for PfENR: NADH (a) and PfENR:butyryl-CoA (b) binary complex formation monitoring changes in, respectively, nucleotide and intrinsic protein fluorescence. (c) Hill logarithmic plot of the data between 10% and 90% active site saturation with butyryl-CoA. Inset represents the fit of double-reciprocal plot of the fluorescence data to an exponential growth equation.

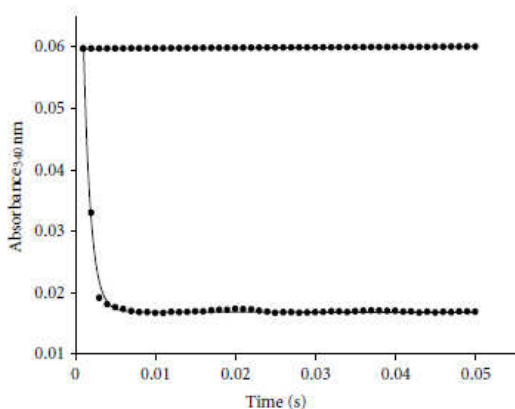


FIGURE 5: Representative stopped-flow trace for NADH \rightarrow NAD⁺ conversion. Fitting the exponential decay data to (5) yielded a value of 1100 (± 29) s⁻¹ for the apparent first-order rate constant of product formation. The top trace represents the chemical control (200 μ M NADH), and the single exponential decay represents the reaction upon mixing 3.14 μ M PfENR and 200 μ M NADH (mixing chamber concentrations).

factors and the intrinsic dissociation constant [36, 37]. A Hill plot of the data (Figure 4(c)) fitted to (4) yielded a value larger than one for h (1.6 ± 0.1). The latter indicates moderate positive homotropic cooperativity on butyryl-CoA binding to tetrameric PfENR, which is further supported by the upward-curved double-reciprocal plot (Figure 4(c)—inset). No intrinsic protein fluorescence change upon addition of crotonoyl-CoA to PfENR could be observed, suggesting that this compound cannot bind to free PfENR enzyme. Protein fluorescence titration with NAD⁺ could not be performed due to large inner filter effect.

3.3. Pre-Steady-State Kinetics. Steady-state kinetics data suggested that PfENR follows a double displacement (“ping-pong”) mechanism. Fluorescence spectroscopy data showed that NADH binds to free enzyme whereas it appears that crotonoyl-CoA cannot. Although butyryl-CoA binding to free enzyme resulted in protein fluorescence quench, it is not certain whether crotonoyl-CoA cannot bind to free enzyme or its binding results in no change in protein fluorescence. Hence, the Ordered Bi Bi and rapid equilibrium random mechanisms could not be ruled out. To try to address this uncertainty, pre-steady-state kinetics measurements were carried out to show whether or not there is hydride transfer in the absence of crotonoyl-CoA as expected for the double displacement mechanism with NADH binding first. Moreover, determination of a value for the apparent first-order rate constant for the course of NADH \rightarrow NAD⁺ conversion could also indicate whether or not this step is rate limiting. It should be pointed out that NADH concentration was in excess as compared to PfENR concentration, so that any burst in product formation could be reliably assessed [41, 42]. Fitting the pre-steady-state

trace showing a single exponential decay upon NADH \rightarrow NAD⁺ conversion (Figure 5) to (5) yielded a value of 1100 (± 29) s⁻¹ for the apparent first-order rate constant for product formation (1 cm pathlength). The NADH \rightarrow NAD⁺ conversion step has thus no contribution to rate-limiting step(s) as its value is much larger than the catalytic rate constant value. There was an apparent accumulation of observable product (NAD⁺) on the enzyme active sites when high concentration of PfENR (3.14 μ M) was mixed with NADH (200 μ M). Taken together, steady-state kinetics, pre-steady-state kinetics, and equilibrium binding data are consistent with a double displacement mechanism for PfENR (Figure 6). In this mechanism, a catalytic event occurs after the binding of NADH to free enzyme (E), generating and releasing NAD⁺ into solution prior to the binding of crotonoyl-CoA to a modified form of the enzyme (F), followed by formation of butyryl-CoA and regeneration of free enzyme (E) (Figure 6). The enzyme mechanism has been shown to be ordered sequential with enoyl-ACP substrate binding first for *Staphylococcus aureus* enoyl reductase [43] and ordered sequential with NADH binding first for *fabV*-encoded enoyl reductase from *Burkholderia mallei* [44]. Although uncommon for reductases/dehydrogenases, double displacement mechanisms have been described for *Enterobacter cloacae* nitroreductase [45], *Salmonella typhimurium* histidinol dehydrogenase [46], bovine liver mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase [47], and mammalian pyruvate dehydrogenase complex [48]. Of course, no mechanism is ever proved; at best one can say that given the current data the likely mechanism for PfENR is double displacement. Further efforts are needed to provide support for either the double displacement mechanism or any other that may give a better description of the experimental results.

Based on substrate binding to immobilized PfENR by Surface Plasmon Resonance (SPR) results, it has been proposed that PfENR enzyme mechanism is random order of substrate addition [49]. Although there have been reports on determination of apparent steady-state kinetics parameters for PfENR [38, 50, 51], to the best of our knowledge, no data have been presented for determination of true steady-state kinetic parameters on which to base a proposal for PfENR enzyme mechanism in solution. To determine the true steady-state kinetic parameters and initial velocity patterns for distinguishing mechanisms, enzyme activity measurements have to be carried out in the presence of varying concentrations of one substrate and several fixed-varied concentrations of the other substrate. Interestingly, the K_d value of 398 μ M for NADH is approximately 8-fold larger than a previously reported value (51.6 μ M) by SPR [49]. These results are somewhat puzzling as equilibrium constants determined by SPR usually match well the values obtained by solution techniques (fluorescence spectroscopy, isothermal titration calorimetry). In addition, a K_d value of 62.5 μ M for crotonoyl-CoA has been determined by SPR measurements [49], whereas no change in intrinsic PfENR protein fluorescence could be detected upon addition of crotonoyl-CoA to free enzyme. Incidentally, the true steady-state value for k_{cat} (6.2 s⁻¹) reported here is approximately

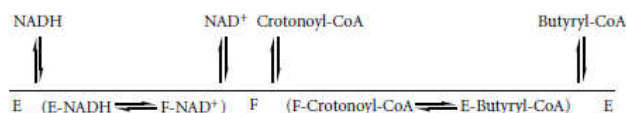


FIGURE 6: Proposed mechanism for the PfENR-catalysed chemical reaction.

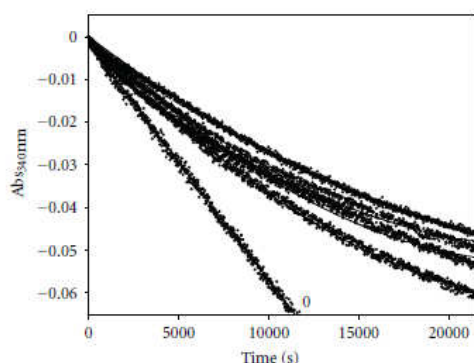


FIGURE 7: Time-dependent inactivation of PfENR by 0–35 μM $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$. The solid curves represent the best fit of the data to (5) for slow-binding inhibition. The assay mixtures were kept at 25°C and contained 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.5, 80 μM crotonoyl-CoA, 120 μM NADH, 2% (vol/vol) glycerol, 49.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BSA, and 0–35 μM $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$. The reactions were initiated by the addition of enzyme (0.69 nM) to the assay mixture and were monitored by following the decrease in NADH absorbance at 340 nm for 21600 s (6 hours).

4-fold larger as compared to an apparent value (1.62 s^{-1}) described elsewhere [51].

3.4. Slow-Onset Inhibition Kinetics of PfENR by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$. We have previously shown that $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ compound (Figure 2(b)) is a slow-onset inhibitor of wild-type and drug-resistant MtInhAs [30, 31, 52]. We then anticipated that $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ may also be an effective inhibitor of PfENR enzyme activity. Prior to embarking on a full analysis of the mode of inhibition of PfENR activity by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ compound, the enzyme was preincubated with inhibitor, and aliquots were withdrawn at different times to measure the remaining residual activity. PfENR inhibition by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ was time dependent (data not shown). Thereby, PfENR slow-binding experiments were carried out in the presence of various concentrations of $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ to try to elucidate the mechanism of the observed time-dependent enzyme inhibition. The progress curves for enzyme activity indicate that $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ is a slow-onset inhibitor of PfENR (Figure 7).

Three basic slow-onset inhibition mechanisms have been described by Morrison and Walsh (Figure 8; [32]).

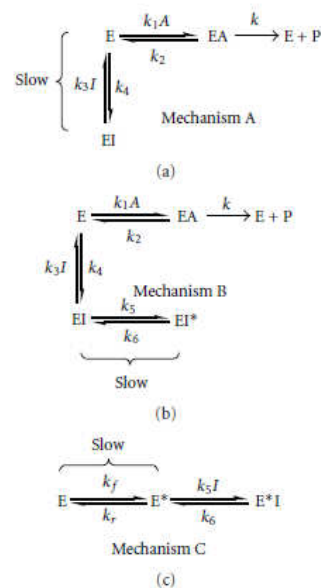


FIGURE 8: Mechanisms that describe reversible slow-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions.

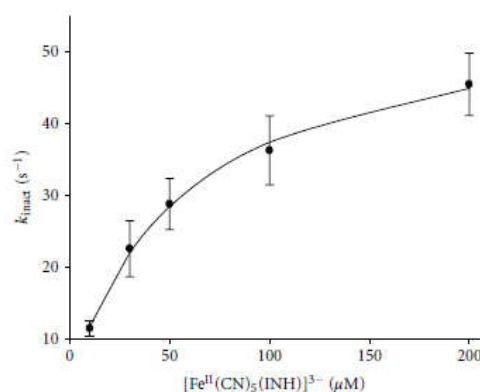


FIGURE 9: Two-step inactivation of PfENR by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$. The values for the apparent first-order rate constant of inactivation (k_{inact}) were obtained from a plot of residual enzyme activity versus time (not shown). The k_{inact} values were plotted against $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ concentration in the preincubation mixture. The data were fitted to (6).

In mechanism A (Figure 8), it is assumed that the time-dependent enzyme inactivation observed is resultant of a slow bimolecular enzyme-inhibitor interaction, because the inhibitor concentration is low and/or due to barriers that the inhibitor encounters in its binding at the enzyme's active site. In mechanism B (Figure 8), it is assumed that there is an initial rapid enzyme-inhibitor interaction to form EI, which then undergoes a slow isomerization (conformational change) to EI* [53]. For inhibitors that conform to this mechanism, the overall dissociation constant (K_i^*) must be lower than the dissociation constant for initially formed complex EI (K_i), a condition that can be satisfied only when $k_6 < k_5$ ($K_i^* = K_i k_6 / (k_5 + k_6)$) and when k_5 and k_6 are slower than all other steps [32]. According to mechanism B, in the presence of a fixed concentration of substrate (A), the value of k_{obs} increases hyperbolically as a function of inhibitor concentration with limiting values of k_6 and $k_5 + k_6$ at, respectively, zero and infinite concentrations of inhibitor. As described in Section 2, k_{obs} in (6) represents the apparent first-order rate constant for the establishment of the equilibrium between EI and EI* complexes (the observed rate constant for formation of EI* or the apparent isomerization rate constant). A third mechanism (mechanism C) has also been described to account for slow-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions (Figure 8). This mechanism involves a slow initial isomerization of two forms of free enzyme in solution (E and E*), followed by a rapid binding of inhibitor to form E*I complex. The k_f and k_r stand, respectively, for the forward and reverse rate constants for the conversion of free enzyme (E) to a form of free enzyme (E*) to which the inhibitor binds. However, fitting the k_{obs} values as a function of $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ inhibitor concentration yielded a plot that did not allow to draw solid conclusions on the mechanism. On the other hand, fitting the initial rate values (v_0) as a function of $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ inhibitor concentration to (7) yielded a value of $40 (\pm 11) \mu\text{M}$ for K_i^{app} . A "true" value of $11 (\pm 3) \mu\text{M}$ for the apparent dissociation constant K_i for the initial enzyme-inhibitor binary complex (EI) could thus be calculated by employing (8).

3.5. Two-Step Mechanism of PfENR Inhibition by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$. The two-step mechanism of PfENR inhibition by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ was assessed by an experiment in which the enzyme was preincubated in the presence of various concentrations of inhibitor and the decrease of PfENR activity was assessed by withdrawing aliquots of enzyme from preincubation mixtures at appropriate intervals, followed by rapid measurement of initial velocity. These results were analyzed in terms of a two-step inhibition mechanism in which the initial rapid binding of the inhibitor to enzyme is followed by a second slow step that results in the final enzyme-inhibitor complex. Since the value of K_i is much larger than K_i^* , the inhibitor concentration in the assay solution is lower than the K_i value ($[I] < K_i$), and there is a large excess of the competitive substrates NADH and crotonoyl-CoA over $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$, the steady-state concentration of EI in the assay solution is kinetically insignificant [31].

The apparent first-order rate constants for PfENR inactivation (k_{inact}) could be calculated from a plot of residual enzyme activity against time for each inhibitor concentration. A plot of k_{inact} values versus inhibitor concentration shows that the k_{inact} values increase hyperbolically as a function of inhibitor concentration (Figure 9), which is consistent with mechanism B (Figure 8). These data were thus fitted to (9), which describes the slow-binding inhibition for mechanism B, yielding values of $58 (\pm 12) \mu\text{M}$ for K_i , $53 (\pm 2) \text{s}^{-1}$ for k_5 , and $4 (\pm 2) \text{s}^{-1}$ for k_6 . A value of $4 \mu\text{M}$ can thus be calculated for the overall inhibition constant ($K_i^* = K_i k_6 / (k_5 + k_6)$). It should be pointed out that an independent estimate for the K_i^* value could be obtained by plotting the final steady-state velocity (v_s) as a function of $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ inhibitor concentration and fitting the data to (7) for competitive inhibition. However, the data were not consistent as the experimental data appear to depart somewhat from the values predicted by fitting the data to (6).

The two-step mechanism followed by $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ inactivation of PfENR involves an enzyme-inhibitor isomerization step. The enzyme isomerization could involve, for instance, a protein conformational change or alteration of water structure at the active site. For the inhibitor, the change could be hydration/dehydration of a carbonyl, change in ionization state, or a conformational change. These alterations could take place in the enzyme-inhibitor complex or in solution [54].

4. Concluding Remarks

The weakness in the use of classical enzyme inhibitors as drugs for clinical conditions is that inhibition results in the upstream accumulation of the substrate for the enzyme, which may overcome the inhibition. By contrast, the build-up of substrate cannot have any effect on the isomerization of enzyme-inhibitor complex typical of the slow-onset mechanism and hence reversal of the inhibition [32]. Moreover, the low half-time value for the limiting step for inhibitor dissociation from the binary complex is a desirable feature since it may be expected to enhance inhibitor's effectiveness [54]. It has recently been proposed by scientists at GlaxoSmithKline (USA) that measurement of the dissociative half-life is a crucial metric of compound optimization and could be a key indicator of *in vivo* duration of efficacy and target selectivity [55]. It has recently been shown that $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ compound has a promising profile in toxicological assays and that it is amenable to large-scale production [56]. These features indicate that $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_5(\text{INH})]^{3-}$ compound is a viable candidate for further studies (including *in vivo* efficacy) and that it may represent a prototype for the development of chemotherapeutic agents to treat malaria.

Acknowledgments

This work was supported by Millennium Initiative Program (CNPq), Brazil, to L. H. P. Silva. The authors also

acknowledge support by National Institute of Science and Technology on Tuberculosis (Decit/SCTIE/MS-MCT-CNPq-FNDCT-CAPES). P. S. M. Medeiros and R. G. Ducati thank fellowships awarded by CNPq.

References

- [1] WHO, World Health Organization, "10 Facts on malaria," WHO, Geneva, Switzerland, 2009, <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/index.html>.
- [2] S. I. Hay, C. A. Guerra, A. J. Tatem, P. M. Atkinson, and R. W. Snow, "Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 1, pp. 81–90, 2005.
- [3] D. C. Warhurst, "Antimalarial drugs. An update," *Drugs*, vol. 33, no. 1, pp. 50–65, 1987.
- [4] H. C. Spencer, W. W. Watkins, D. G. Sixsmith, and D. K. Koech, "Response of *Plasmodium falciparum* to dihydrofolate reductase inhibitors in Malindi, Kenya," *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 80, no. 2, pp. 201–203, 1986.
- [5] J. H. McKie, K. T. Douglas, C. Chan et al., "Rational drug design approach for overcoming drug resistance: application to pyrimethamine resistance in malaria," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 41, no. 9, pp. 1367–1370, 1998.
- [6] N. M. Carballeira, "New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents," *Progress in Lipid Research*, vol. 47, no. 1, pp. 50–61, 2008.
- [7] C. Wongsrichanalai, A. L. Pickard, W. H. Wernsdorfer, and S. R. Meshnick, "Epidemiology of drug-resistant malaria," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 2, no. 4, pp. 209–218, 2002.
- [8] P. Piola, C. Fogg, F. Bajunirwe et al., "Supervised versus unsupervised intake of six-dose artemether-lumefantrine for treatment of acute, uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Mbarara, Uganda: a randomised trial," *The Lancet*, vol. 365, no. 9469, pp. 1467–1473, 2005.
- [9] G. I. McFadden and D. S. Roos, "Apicomplexan plastids as drug targets," *Trends in Microbiology*, vol. 7, no. 8, pp. 328–333, 1999.
- [10] R. F. Waller, P. J. Keeling, R. G. K. Donald et al., "Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 21, pp. 12352–12357, 1998.
- [11] S. A. Ralph, G. G. van Dooren, R. F. Waller et al., "Metabolic maps and functions of the *Plasmodium falciparum* apicoplast," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 3, pp. 203–216, 2004.
- [12] D. Tasdemir, "Type II fatty acid biosynthesis, a new approach in antimalarial natural product discovery," *Phytochemistry Reviews*, vol. 5, no. 1, pp. 99–108, 2006.
- [13] H. J. Vial, P. Eldin, A. G. M. Tielens, and J. J. van Hellemond, "Phospholipids in parasitic protozoa," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 126, no. 2, pp. 143–154, 2003.
- [14] P. Sinnis and B. K. L. Sim, "Cell invasion by the vertebrate stages of *Plasmodium*," *Trends in Microbiology*, vol. 5, no. 2, pp. 52–58, 1997.
- [15] C. O. Rock and J. E. Cronan, "*Escherichia coli* as a model for the regulation of dissociable (type II) fatty acid biosynthesis," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1302, no. 1, pp. 1–16, 1996.
- [16] N. Surolia and A. Surolia, "Triclosan offers protection against blood stages of malaria by inhibiting enoyl-ACP reductase of *Plasmodium falciparum*," *Nature Medicine*, vol. 7, no. 2, pp. 167–173, 2001.
- [17] G. Weeks and S. J. Wakil, "Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. 18. Preparation and general properties of the enoyl acyl carrier protein reductases from *Escherichia coli*," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 243, no. 6, pp. 1180–1189, 1968.
- [18] A. Banerjee, E. Dubnau, A. Quemard et al., "*inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*," *Science*, vol. 263, no. 5144, pp. 227–230, 1994.
- [19] K. Johnson, D. S. King, and P. G. Schultz, "Studies on the mechanisms of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 117, no. 17, pp. 5009–5010, 1995.
- [20] K. Johnson and P. G. Schultz, "Mechanistic studies of the oxidation of isoniazid by the catalase peroxidase from *Mycobacterium tuberculosis*," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 116, no. 16, pp. 7425–7426, 1994.
- [21] B. Heym, P. M. Alzari, N. Honoré, and S. T. Cole, "Missense mutations in the catalase-peroxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*," *Molecular Microbiology*, vol. 15, no. 2, pp. 235–245, 1995.
- [22] S. V. Ramaswamy, R. Reich, S. J. Dou et al., "Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, no. 4, pp. 1241–1250, 2003.
- [23] D. A. Rozwarski, G. A. Grant, D. H. R. Barton, W. R. Jacobs, and J. C. Sacchettini, "Modification of the NADH of the isoniazid target (*InhA*) from *Mycobacterium tuberculosis*," *Science*, vol. 279, no. 5347, pp. 98–102, 1998.
- [24] B. Lei, C. J. Wei, and S. C. Tu, "Action mechanism of anti-tubercular isoniazid: activation by *Mycobacterium tuberculosis* *KatG*, isolation, and characterization of *InhA* inhibitor," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 4, pp. 2520–2526, 2000.
- [25] R. Rawat, A. Whitty, and P. J. Tonge, "The isoniazid-NAD adduct is a slow, tight-binding inhibitor of *InhA*, the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase: adduct affinity and drug resistance," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 2, pp. 13881–13886, 2003.
- [26] R. S. Magliozzo and J. A. Marcinkeviciene, "The role of Mn(II)-peroxidase activity of mycobacterial catalase-peroxidase in activation of the antibiotic isoniazid," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 14, pp. 8867–8870, 1997.
- [27] S. Chouchane, S. Giroto, S. Yu, and R. S. Magliozzo, "Identification and characterization of tyrosyl radical formation in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (*KatG*)," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 45, pp. 42633–42638, 2002.
- [28] M. Wilming and K. Johnson, "Spontaneous formation of the bioactive form of the tuberculosis drug isoniazid," *Angewandte Chemie*, vol. 38, no. 17, pp. 2588–2590, 1999.
- [29] M. Nguyen, A. Quemard, H. Marrakchi, J. Bernadou, and B. Meunier, "The nonenzymatic activation of isoniazid by Mn^{III}-pyrophosphate in the presence of NADH produces the inhibition of the enoyl-ACP reductase *InhA* from *Mycobacterium tuberculosis*," *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences—Series II*, vol. 4, no. 1, pp. 35–40, 2001.
- [30] J. S. Oliveira, E. H. S. Sousa, L. A. Basso et al., "An inorganic iron complex that inhibits wild-type and an isoniazid-resistant mutant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis*," *Chemical Communications*, vol. 10, no. 3, pp. 312–313, 2004.

- [31] J. S. Oliveira, E. H. S. de Sousa, O. N. de Souza, I. S. Moreira, D. S. Santos, and L. A. Basso, "Slow-onset inhibition of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from *Mycobacterium tuberculosis* by an inorganic complex," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 12, no. 19, pp. 2409–2424, 2006.
- [32] J. F. Morrison and C. T. Walsh, "The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors," *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, vol. 61, pp. 201–301, 1988.
- [33] H. J. Smith and C. Simons, *Enzymes and Their Inhibition: Drug Development*, CRC Enzyme Inhibitors Series, CRC Press, Boca Raton, Fla, USA, 2005.
- [34] L. Michaelis and M. L. Menten, "Die Kinetik der Invertinwirkung," *Biochemische Zeitschrift*, vol. 49, pp. 333–369, 1913.
- [35] A. V. Hill, "The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide," *Biochemical Journal*, vol. 7, no. 5, pp. 471–480, 1913.
- [36] I. H. Segel, *Enzyme Kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 1975.
- [37] G. Weber, "Energetics of ligand binding to proteins," *Advances in Protein Chemistry*, vol. 29, pp. 1–83, 1975.
- [38] M. Kapoor, J. Gopalakrishnapai, N. Surolia, and A. Surolia, "Mutational analysis of the triclosan-binding region of enoyl-ACP (acyl-carrier protein) reductase from *Plasmodium falciparum*," *Biochemical Journal*, vol. 381, no. 3, pp. 735–741, 2004.
- [39] W. Liu, C. J. Rogers, A. J. Fisher, and M. D. Toney, "Aminophosphonate inhibitors of dialkylglycine decarboxylase: structural basis for slow binding inhibition," *Biochemistry*, vol. 41, no. 41, pp. 12320–12328, 2002.
- [40] H. Lineweaver and D. Burk, "The determination of enzyme dissociation constants," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 56, no. 3, pp. 658–666, 1934.
- [41] K. Hiromi, *Kinetics of Fast Enzyme Reactions: Theory and Practice*, Kodansha, 1979.
- [42] L. A. Basso, P. C. Engel, and A. R. Walmsley, "The mechanism of substrate and coenzyme binding to clostridial glutamate dehydrogenase during reductive amination," *European Journal of Biochemistry*, vol. 234, no. 2, pp. 603–615, 1995.
- [43] H. Xu, T. J. Sullivan, J. I. Sekiguchi et al., "Mechanism and inhibition of saFabI, the enoyl reductase from *Staphylococcus aureus*," *Biochemistry*, vol. 47, no. 14, pp. 4228–4236, 2008.
- [44] H. Lu and P. J. Tonge, "Mechanism and inhibition of the FabV Enoyl-ACP reductase from *Burkholderia mallei*," *Biochemistry*, vol. 49, no. 6, pp. 1281–1289, 2010.
- [45] R. L. Koder and A. F. Miller, "Steady-state kinetic mechanism, stereospecificity, substrate and inhibitor specificity of *Enterobacter cloacae* nitroreductase," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1387, no. 1–2, pp. 395–405, 1998.
- [46] H. Görisch, "Steady-state investigations of the mechanism of histidinol dehydrogenase," *Biochemical Journal*, vol. 181, no. 1, pp. 153–157, 1979.
- [47] V. Hines and M. Johnston, "Analysis of the kinetic mechanism of the bovine liver mitochondrial dihydroorotate dehydrogenase," *Biochemistry*, vol. 28, no. 3, pp. 1222–1226, 1989.
- [48] C. S. Tsai, M. W. Burgett, and L. J. Reed, "α Keto acid dehydrogenase complexes. XX. A kinetic study of the pyruvate dehydrogenase complex from bovine kidney," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 248, no. 24, pp. 8348–8352, 1973.
- [49] M. Kapoor, P. L. S. Mukhi, N. Surolia, K. Suguna, and A. Surolia, "Kinetic and structural analysis of the increased affinity of enoyl-ACP (acyl-carrier protein) reductase for triclosan in the presence of NAD⁺," *Biochemical Journal*, vol. 381, no. 3, pp. 725–733, 2004.
- [50] R. Perozzo, M. Kuo, A. B. S. Sidhu et al., "Structural elucidation of the specificity of the antibacterial agent triclosan for malarial enoyl acyl carrier protein reductase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 15, pp. 13106–13114, 2002.
- [51] M. Kapoor, M. J. Dar, A. Surolia, and N. Surolia, "Kinetic determinants of the interaction of enoyl-ACP reductase from *Plasmodium falciparum* with its substrates and inhibitors," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 289, no. 4, pp. 832–837, 2001.
- [52] I. B. Vasconcelos, E. Meyer, F. A. M. Sales, I. S. Moreira, L. A. Basso, and D. S. Santos, "The mode of inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* wild-type and isoniazid-resistant 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase enzymes by an inorganic complex," *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, vol. 7, no. 1, pp. 50–62, 2008.
- [53] J. F. Morrison, "The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions," *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 7, no. 3, pp. 102–105, 1982.
- [54] J. V. Schloss, "Significance of slow-binding enzyme inhibition and its relationship to reaction-intermediate analogues," *Accounts of Chemical Research*, vol. 21, no. 9, pp. 348–353, 1988.
- [55] P. J. Tummino and R. A. Copeland, "Residence time of receptor—ligand complexes and its effect on biological function," *Biochemistry*, vol. 47, no. 20, pp. 5481–5492, 2008.
- [56] L. A. Basso, C. Z. Schneider, A. J. A. B. Dos Santos et al., "An inorganic complex that inhibits *Mycobacterium tuberculosis* enoyl reductase as a prototype of a new class of chemotherapeutic agents to treat tuberculosis," *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol. 21, no. 7, pp. 1384–1389, 2010.