



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÊNFASE EM FARMACOLOGIA MOLECULAR E BIOQUÍMICA

MARIANE ROTTA

**EFEITOS DO CROWDING MACROMOLECULAR NA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA 2-trans-ENOIL-ACP (COA) REDUTASE DE *Mycobacterium
tuberculosis***

Porto Alegre,

2016.

MARIANE ROTTA

**EFEITOS DO CROWDING MACROMOLECULAR NA ATIVIDADE
ENZIMÁTICA DA 2-*trans*-ENOIL-ACP (COA) REDUTASE DE *Mycobacterium
tuberculosis***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Dr. Luiz Augusto Basso

Porto Alegre,

2016.

MARIANE ROTTA

**EFEITOS DO CROWDING MACROMOLECULAR NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA
DA 2-*trans*-ENOIL-ACP (COA) REDUTASE DE *Mycobacterium tuberculosis***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. André Arigony Souto

Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi

Prof. Dr. Mauricio Reis Bogo

Prof. Dr. Rafael Andrade Caceres

Porto Alegre, 2016

Ficha Catalográfica

R851e Rotta, Mariane

Efeitos do crowding macromolecular na atividade enzimática da 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis* / Mariane Rotta . – 2016.

134 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Basso.

Co-orientadora: Profa. Dra. Anne Drumond Villela.

1. Bioquímica. 2. Cinética enzimática. 3. Biologia Molecular. I. Basso, Luiz Augusto. II. Villela, Anne Drumond. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico esse trabalho aos meus pais, pelo amor incondicional.
Ao meu orientador, professor Basso, pela ajuda e exemplo profissional e ao meu amigo
Rogério (*in memoriam*) -

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Michelângelo e Raquel. Muito obrigada por abrir mão de coisas na vida em prol dos meus estudos e meu crescimento pessoal. Obrigado pelo carinho, pela paciência, educação e por me darem bases sólidas em termos de estrutura familiar e caráter. Agradeço também ao meu irmão Néelson pelo amor a literatura e o amor de irmão.

Agradeço meu orientador Basso, alguém que eu admiro muito, que soube ser paciente e compreensivo neste ano. Considero-o um exemplo de pessoa e de profissional.

Agradeço ao Carlos, pelo apoio, incentivo e paciência. Por todos os anos que passaram, obrigado. Pelos anos que virão - que possamos ir juntos.

Agradeço meus amigos Bruno e Rogério (*in memoriam*), por estarem sempre comigo, com paciência e com muita compreensão. Agradeço pelos dias alegres, pela amizade sincera, pelas discussões filosóficas, políticas, discussões sobre livros, cinema, dentre outras. De uma maneira muito especial e única vocês contribuíram para meu crescimento pessoal.

Agradeço aos meus amigos Daiana, Paulo e Fernanda. Por compartilharem comigo as felicidades e as tristezas. Pelo suporte no momento difícil e pelo abraço amigo naquela hora necessária. Agradeço por tornarem minha vida mais leve e feliz.

Agradeço aos demais professores do CPBMF, em especial ao professor Diógenes, pela oportunidade de trabalho. Ao professor Osmar N. de Souza, pela colaboração no trabalho, mas principalmente pelo ombro amigo.

Agradeço todos os colegas de trabalho do CPBMF em especial Larissa, Adílio, Anne, Kênia, Junior, Leonardo, Luíza, Pedro, Fernanda M., Natália, Gaby e Ju pelo companheirismo e boas risadas.

Agradeço ao Luis Fernando Timmers, pela colaboração no meu trabalho, ajudando em todas as vezes que eu precisei e também pela amizade.

Agradeço também a nossa secretária Águida, a Márcia, as meninas de limpeza e a Glê, pela função fundamental desempenhada por elas, que auxiliou e facilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço as minhas amigas: Luíza, Thaís, Melise, Esther, Prica, Júlia, Mayara e Marci. Por tudo o que vivemos, pelo apoio sempre que necessitei, pelo ombro amigo, por fornecerem uma perspectiva diferente de vida e de ponto de vista.

Agradeço a Unversidade Federal de Santa Maria, pelo ensino público, gratuito e de altíssima qualidade. À FAPERGS e ao CNPq pelas bolsas de iniciação científica. Ao CNPq pelas bolsas de mestrado e doutorado.

“A cada dia que vivo mais me convenço que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade. A dor é inevitável. O sofrimento é opcional.”

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

O meio intracelular é uma solução aquosa complexa, pois é preenchida por diversos tipos de macromoléculas. Espera-se que essa grande concentração de macromoléculas resulte em um comportamento não ideal para a solução. Para mimetizar o ambiente intracelular, os efeitos da ocupação macromolecular são comumente estudados *in vitro* utilizando agentes de *crowding*. O objetivo central do presente estudo é avaliar os possíveis efeitos de agentes de *crowding* macromolecular sintéticos nos parâmetros cinéticos aparentes de estado-estacionário (K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m) para a reação química catalisada pela 2-*trans*-enoil-ACP(CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis* (InhA). Os resultados mostraram que ficoll 70, ficoll 400 e dextran 70 têm efeitos negligenciáveis na atividade da InhA na faixa de concentração utilizada. Por outro lado, um complexo efeito foi observado na presença do PEG 6000. A sacarose, que foi utilizada como controle nos experimentos, reduziu os valores de k_{cat}/K_m para o NADH e k_{cat} para o 2-*trans*-dodecenoil-CoA de uma maneira concentração-dependente. Os resultados de dinâmica molecular sugerem que a InhA adota uma forma mais compacta na presença de sacarose, o que provavelmente tem efeitos nos resultados de cinética de estado-estacionário. A presença dos agentes de *crowding* parece alterar a abundância relativa dos diferentes confôrmeros da InhA em solução. Os efeitos do *crowding* macromolecular na energia (E_a e E_{η}), entalpia (ΔH^\ddagger), entropia (ΔS^\ddagger) e energia livre de Gibbs de ativação (ΔG^\ddagger) foram determinados. Os valores de ΔG^\ddagger para todos os agentes de *crowding* testados foram similares ao tampão Pipes 100 mM, sugerindo que os efeitos do volume excluído não facilitam a formação do complexo ativado estável ES^\ddagger . A não linearidade do gráfico de Arrhenius para o PEG 6000 sugere que interações “brandas” possam atuar nos efeitos do *crowding* macromolecular.

Palavras-chave: 2-*trans*-enoil-ACP(CoA) redutase, *crowding* macromolecular, efeitos volume excluído, termodinâmica, dinâmica molecular

ABSTRACT

The cellular milieu is a complex and crowded aqueous solution. It is thus expected that this large concentration of macromolecules causes deviations from solution ideality. To mimic the intracellular environment, crowding effects are commonly studied in vitro using crowding agents. The aim of the present study was to evaluate the effects of macromolecular synthetic crowding agents on the apparent steady-state kinetic parameters (K_m , k_{cat} , and k_{cat}/K_m) for the chemical reaction catalyzed by 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) from *Mycobacterium tuberculosis* (InhA). The results showed that ficoll 70, ficoll 400, and dextran 70 had negligible effects on InhA activity in the range of concentrations used. On the other hand, a complex effect was observed for PEG 6000. Sucrose, which was employed in control experiments, decreased both the k_{cat}/K_m values for NADH and k_{cat} for 2-*trans*-dodecenoyl-CoA (DD-CoA) substrate in a concentration-dependent manner. Molecular dynamics results suggest that InhA adopts a more compact conformer in sucrose solution, which likely accounts for the steady-state kinetic results. The presence of crowding agents appears to alter the relative abundance of different conformers of InhA in solution. The effects of the crowding agents on the energy (E_a and E_{η}), enthalpy (ΔH^\ddagger), entropy (ΔS^\ddagger), and Gibbs free energy (ΔG^\ddagger) of activation were determined. The ΔG^\ddagger values for all crowding agents tested were similar to dilute buffer, suggesting that excluded volume effects did not facilitate stable activated ES^\ddagger complex formation. Nonlinear Arrhenius plot for PEG 6000 suggests that "soft" interactions may play a role in macromolecular crowding effects.

Keywords: 2-*trans*-enoyl-ACP(CoA) reductase, macromolecular *crowding*, volume excluded effects, thermodynamics, molecular dynamics

Lista de Figuras e Esquemas

Figura 1. Estimativa de novos casos de TB, em 2015.....	16
Figura 2. Representação da parede celular micobacteriana.....	18
Figura 3. Estrutura química dos ácidos micólicos identificados em <i>M. tuberculosis</i>	19
Figura 4. Cadeia polipeptídica da InhA.....	22
Figura 5. Tríade catalítica da InhA.....	25
Figura 6. Local de ação de alguns fármacos anti-TB	27
Figura 7. Os estados <i>crowded</i> do citoplasma.	30
Figura 8. Representação esquemática e um ambiente <i>crowded</i>	31
Figura 9. Gráficos de correlação linear entre os valores de densidade obtidos <i>versus</i> a concentração dos agentes de <i>crowding</i>	49
Figura 10. Viscosidade intrínseca reduzida <i>versus</i> concentração do agente de <i>crowding</i>	50
Figura 11. Parâmetros cinéticos relativos determinados para os substratos NADH e DD-CoA	51
Figura 12. Gráfico de Arrhenius para os diferentes agentes de <i>crowding</i>	52
Figura 13. Mudança do perfil hiperbólico para sigmoidal para o substrato DD-CoA.	54
Figura 14. Estrutura química do polímero ficoll	56
Figura 15. Efeitos nos parâmetros cinéticos aparentes e termodinâmicos de ativação da inha na presença ficoll 70 e 400	57
Figura 16. Estrutura Química do Dextran	58
Figura 17. Efeitos nos parâmetros cinéticos aparentes e termodinâmicos de ativação na presença dextran 70	59
Figura 18. Estrutura Química do PEG.....	60
Figura 19. Efeitos nos parâmetros cinéticos aparentes e termodinâmicos de ativação na presença PEG 6000.....	61
Figura 20. Gráficos de Arrhenius para os agentes de <i>crowding</i>	63
Figura 21. Estrutura química da Sacarose	65
Figura 22. Efeitos nos parâmetros cinéticos aparentes e termodinâmicos de ativação na presença sacarose.....	65
Figura 23. Distribuição do volume relativo da cavidade do sítio ativo relativo a subunidade A.	67
Figura 24. Fator de Temperatura para todas as simulações de DM da InhA durante a fase de produção.	68
Figura 25. Fator de Temperatura para cada subunidade da InhA tetramérica, durante a simulação com 25 mg/mL de sacarose.	69
Figura 26. Distribuição do volume de cavidade do sítio ativo da InhA.	70
Figura 27. Box plot para a variância do volume da cavidade do sítio ativo da InhA durante a simulação com 200 mg/mL.	71

Lista de Equações

Equação (1) $\mu_i^{ideal} = \mu_i^\circ + RT \ln c_i$

Equação (2) $\mu_i^{real} = \mu_i^\circ + RT \ln \alpha_i = \mu_i^\circ + RT \ln c_i + \mu_i^\circ + RT \ln \gamma_i$

Equação (3) $\rho = \rho^\circ + (1 - \bar{v}\rho^\circ)c$

Equação (4) $\bar{v} \cdot v = m$ $m \cdot v = \text{vol. ocupação fracional}$

Equação (5) $\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta^\circ}{\eta^\circ}$

Equação (6) $\eta_{sp} = \frac{10\pi R^3 c_m}{3m}$

Equação (7) $[\eta] \equiv \lim_{c_m \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c_m} \right) = \frac{10\pi R^3}{3m}$

Equação (8) $\frac{\eta_{sp}}{c_m} = [\eta] + k[\eta]^2 c_m + k' c_m^2$

Equação (9) $v = \frac{VA}{K_m + A}$

Equação (10) $k_{cat} = \frac{V}{[E]_t}$

Equação (11) $v = \frac{V_{max} [S]}{K_{0.5}^n + [S]}$

Equação (12) $\ln k_{cat} = \ln A - \left(\frac{E_a}{R} \right) \frac{1}{T}$

Equação (13) $\Delta H^\# = E_a - RT$

Equação (14) $\Delta G^\# = RT \left(\ln \frac{k_B}{h} + \ln T - \ln k_{cat} \right)$

Equação (15) $\Delta S^\# = \frac{\Delta H^\# - \Delta G^\#}{T}$

Equação (16)

$$(\Delta G)_{Err} = \frac{RT(k_{cat})_{Err}}{k_{cat}}$$

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Tuberculose	16
1.2. Via de biossíntese de ácidos micólicos e a enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase no <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
1.3. Macromolecular crowding	30
1.3.1 O fenômeno do volume-excluído	31
1.3.2 Efeitos do volume excluído no equilíbrio químico	32
1.3.3. Efeito do volume excluído na cinética enzimática.....	33
1.3.4. Abordagens que mimetizam os efeitos do volume excluído.....	34
2. Objetivos.....	35
2.1. Objetivo geral.....	35
2.2. Objetivos específicos	35
2.2.1. Parâmetros físico-químicos.....	35
2.2.2. Parâmetros cinéticos.....	36
2.2.3. Parâmetros termodinâmicos	36
2.2.4. Estudos de dinâmica molecular.....	36
3. Justificativa.....	37
4. Procedimento Experimental	39
4.1. Geral.....	39
4.2. Parâmetros físico-químicos.....	39
4.2.1. Medidas de densidade e viscosidade	39
4.2.2. Cálculo do volume específico parcial e do volume de ocupação fracional	40
4.3. Parâmetros cinéticos	41
4.3.1. Expressão e purificação da 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	41
4.3.2. Ensaio enzimático.....	42
4.4. Parâmetros termodinâmicos.....	44
4.4.1. Energia de Ativação	44
4.5. Dinâmica Molecular.....	45
4.5.1. Simulações por dinâmica molecular da InhA em condições de volume excluído:.....	45

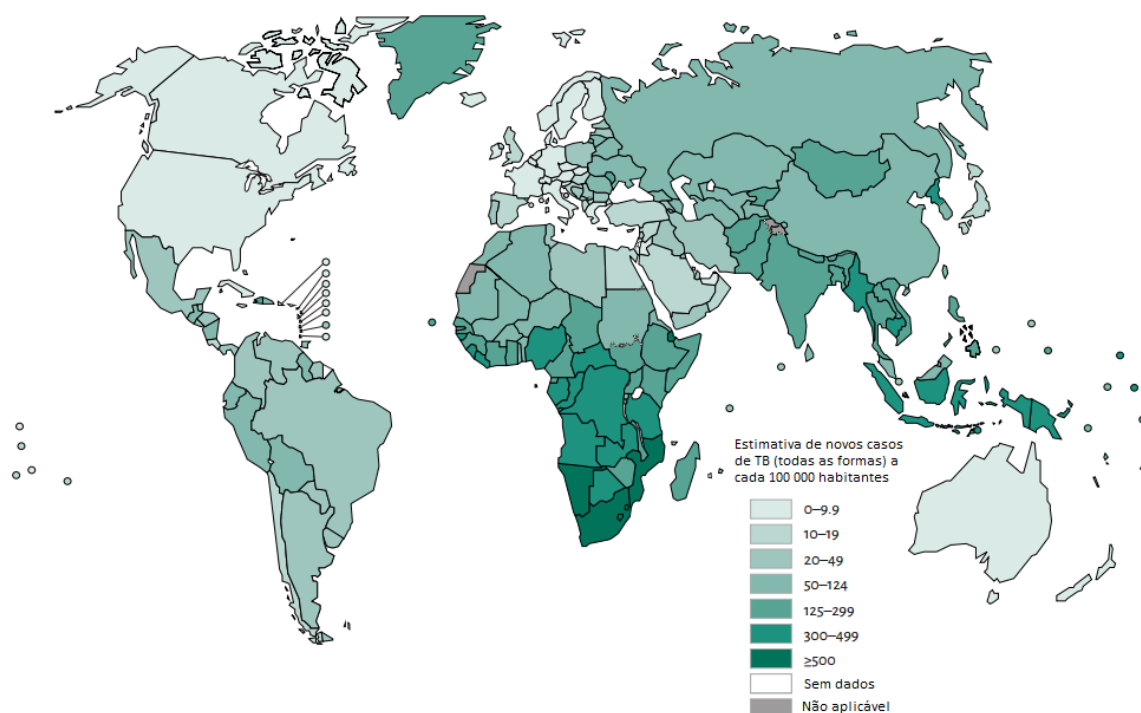
5. Discussão dos Resultados.....	46
5.1. Parâmetros físico-químicos.....	48
5.1.2. Densidade, viscosidade, volume específico parcial, volume de ocupação fracional, raio hidrodinâmico e raio hidrodinâmico intrínseco.....	48
5.2. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos	51
5.2.1. Parâmetros cinéticos de estado-estacionário para os substratos NADH e DD-CoA e parâmetros termodinâmicos de ativação em Pipes 100 mM.....	51
5.2.2. Os agentes de crowding macromolecular deslocam o equilíbrio entre as conformações na InhA em solução	52
5.2.3. Agentes de crowding ficoll 70 e ficoll 400	56
5.2.4. Agente de crowding dextran 70.....	58
5.2.5. Agente de crowding PEG 6000	60
5.2.6. Sacarose	65
6. Conclusões.....	72
7. Referências	74
Anexos.....	82

1. Introdução

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é considerada um dos maiores problemas de saúde do mundo. Milhões de pessoas são acometidos por essa doença e, juntamente com o vírus da imunodeficiência humana (HIV), é uma das principais causas de morte do planeta (WHO, 2016). Estima-se que no ano de 2015 o surgimento de novos casos tenha sido na faixa dos 9 milhões: 5 milhões de homens, 3 milhões de mulheres e 1 milhão de crianças. Contabiliza-se também 1,5 milhão de mortes (aproximadamente 1 milhão de HIV-positivos e 400 mil de HIV-negativos). O número de mortes é considerado inaceitavelmente elevado, pois com precisão e rapidez do diagnóstico e um tratamento correto a maioria das pessoas poderiam ter sido curadas. A figura 1 apresenta a estimativa de novos casos de TB a cada 100 000 habitantes para o ano de 2015.

FIGURA 1. ESTIMATIVA DE NOVOS CASOS DE TB, EM 2015.



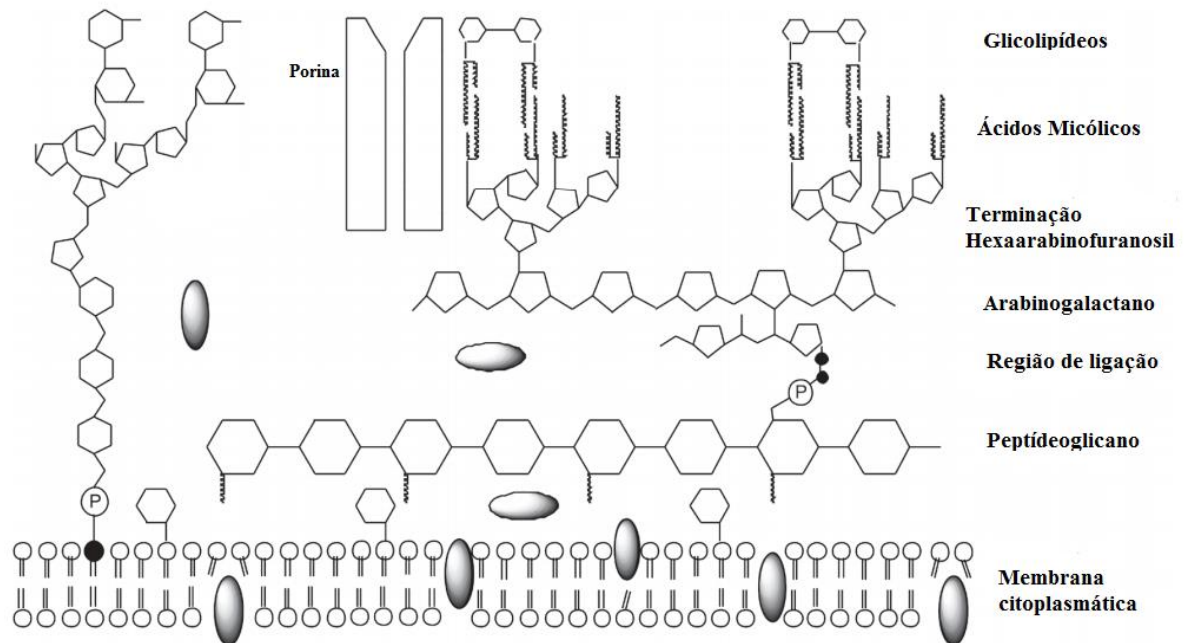
Fonte: Adaptado de WHO (2015).

Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como um problema emergencial de saúde pública global, finalizando um longo período de negligência em relação a essa doença. Através da implementação do *DOTS* (do inglês: Tratamento direcionado de curta duração) (1994-2005) e do programa *Stop TB strategy* (2006-2015) estabeleceram-se as bases necessárias para o diagnóstico e tratamento dessa doença (WHO, 2016).

Entre os anos de 2000 e 2014, as melhorias nos métodos de diagnóstico e tratamento da TB ajudaram a salvar 43 milhões de vida em todo o mundo. Entretanto, enquanto o maior acesso ao diagnóstico correto e ao tratamento efetivo notavelmente reduziram o sofrimento e as taxas de morte, resultados menos significativos foram observados em termos da redução nas taxas de incidência da epidemia da TB (WHO, 2016). Dessa forma, contínuos esforços para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, como novos fármacos, medidas profiláticas, como vacinas, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico eficientes e rápidos, bem como maior entendimento da patologia da doença e da biologia do bacilo ainda se fazem necessários.

1.2. Via de biossíntese de ácidos micólicos e a enzima 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase no Mycobacterium tuberculosis

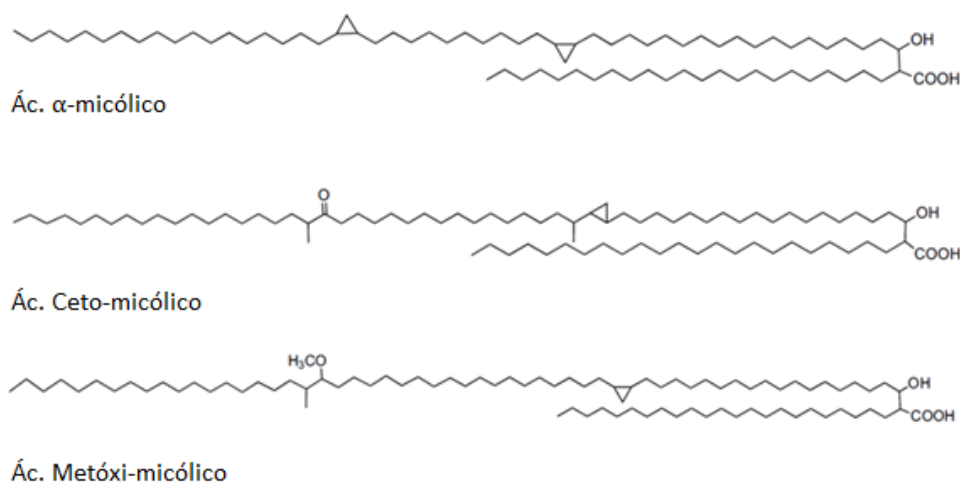
O principal agente causador da TB é patógeno bacteriano *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*). Seu envelope celular tem características distintas e está relacionado com a patogenicidade do bacilo (Takayama *et. al.*, 2005). Essa micobactéria é considerada gram-positiva e classificada como bacilo álcool-ácido resistente, de acordo com a coloração de Ziehl-Neelson, propriedade que está relacionada com a estrutura da sua parede celular. O envelope celular da micobactéria é composto por três maiores componentes: a membrana plasmática, ligado covalentemente a ela está o complexo peptídeoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos (PAM) e glicolípídeos livres (trealose dimoicolato) localizados mais internamente (Figura 2) (Takayama *et. al.*, 2005; Schroeder *et. al.* 2002). Esta estrutura compõe uma espessa camada de lipídeos na região externa da célula e protege o bacilo da TB do sistema imune do hospedeiro e de elementos nocivos (Takayama *et. al.*, 2005).

FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO DA PAREDE CELULAR MICOBACTERIANA

Fonte: Adaptado de Schroeder *et. al.* (2002).

A constituição dessa parede é 60% de lipídeos, os quais são predominantemente compostos por ácidos graxos incomuns de cadeia carbônica longa (60 - 90 carbonos) denominados ácidos micólicos (Ducati *et. al.*, 2006). Os ácidos micólicos são ácidos graxos α -alquil, β -hidroxi ramificados e são a assinatura lipídica da parede celular hidrofóbica da micobactéria. Possuem uma α -ramificação curta e saturada de 20 - 26 carbonos e uma cadeia carbônica longa principal de 50 - 60 carbonos denominada cadeia meromicólica. Os três principais tipos de ácidos micólicos produzidos pelo *M. tuberculosis* são os α -micolatos, metoximicolatos e cetomicolatos (Figura 3). Esses ácidos micólicos estão associados com a virulência (Takayama *et. al.*, 2005), a habilidade do bacilo de sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos e a incapacidade de muitos antibióticos penetrarem no citosol do bacilo (Brennan *et. al.*, 1995; Barry III *et. al.*, 1998).

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA DOS ÁCIDOS MICÓLICOS IDENTIFICADOS EM *M. TUBERCULOSIS*



Fonte: adaptado de Bernardes-Génisson *et. al.* (2013).

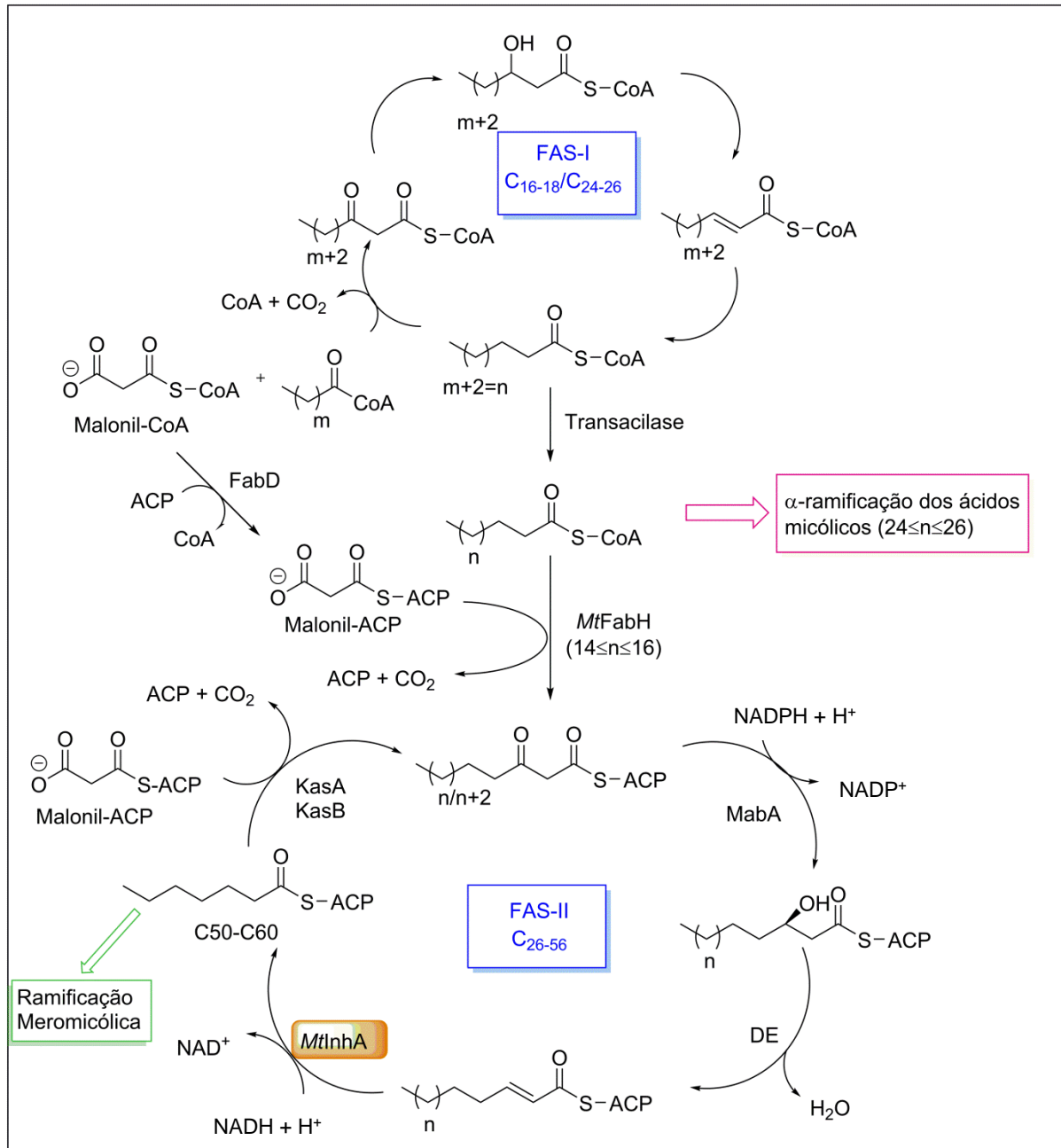
A biossíntese dos ácidos micólicos, nas micobactérias, ocorre em cinco etapas distintas: (i) síntese dos ácidos graxos de cadeia curta e saturada com 20 - 26 carbonos para a α -ramificação; (ii) síntese dos ácidos meromicólicos para compor a cadeia carbônica principal; (iii) introdução dos grupos funcionais na cadeia meromicólica; (iv) condensação de Claisen entre a α -ramificação curta e a cadeia meromicólica, seguida por uma redução; (v) diversos processos de micoliltransferases para os lipídeos celulares (Schroeder *et. al.*, 2002). No *M. tuberculosis*, o alongamento dos ácidos graxos, que compõem os ácidos micólicos, ocorre através de ciclos repetidos de condensação, β -ceto redução, desidratação e enoil redução. Estas etapas são catalisadas, respectivamente, pelas enzimas β -cetoacil sintase (KAS – do inglês *β -ketoacyl synthase* ou FabH), β -cetoacil redutase (KAR – do inglês *β -ketoacyl reductase* ou MabA), β -hidroxiacil desidratase (DE – do inglês *β -hydroxyacyl dehydratase*) e enoil redutase (ENR – do inglês *enoyl reductase*, InhA ou 2-*trans*-enoil-ACP (acyl carrier protein) redutase). As reações químicas são catalisadas nos sistemas I e II de síntese de ácidos graxos (Sistema FAS – do inglês *fatty acid synthase*) (Schroeder *et. al.*, 2002).

O sistema FAS-I está presente em todos os eucariotos, exceto em plantas, e é composto por uma enzima multifuncional que apresenta uma única cadeia polipeptídica (Cronan e Rock, 1996). O sistema FAS-I das micobactérias catalisa a síntese de ácidos graxos com cadeias de carbonos C₁₆ e C₁₈ (os quais são os produtos da síntese *de novo*) e também o alongamento desses para produção de cadeias de C₂₄ e C₂₆ utilizando acetil-Coenzima A (CoA) e malonil-CoA (Bloch, 1975; Wood *et. al.*, 1977). Os produtos acil-CoA (C₂₄ - C₂₆) do sistema FAS-I

podem ser os precursores para o sistema FAS-II ou podem não participar do alongamento e serem utilizados como substratos para a formação das α -ramificações dos ácidos micólicos (Esquema 1) (Schroeder *et. al.*, 2002). Diferentemente da maioria dos organismos, as micobactérias possuem ambos os sistemas, FAS-I e FAS-II (Brindley *et. al.*, 1969).

O sistema FAS-II, presente em bactérias e plantas, catalisa as reações de biossíntese por enzimas diferentes codificadas por genes únicos. O sistema FAS-II não realiza síntese *de novo*, mas é no FAS-II que o substrato malonil-ACP é incorporado pelas enzimas KasA e KasB resultando no produto β -cetoacil-ACP, que por sua vez é reduzido pela enzima MabA. O álcool secundário resultante desta redução sofre uma desidratação à enoil-ACP α,β -insaturado (*trans*- Δ^2 -enoil-ACP). O produto *trans*- Δ^2 -enoil-ACP é reduzido pela InhA levando à formação de uma cadeia carbônica saturada. Finalmente, subsequentes etapas de alongamento dos ácidos graxos são iniciadas pela ação da KasA e KasB, até a formação do produto com cadeia carbônica de C₅₀ - C₆₀ (Esquema 1) (Schroeder *et. al.*, 2002; Pan e Tonge, 2012).

ESQUEMA 1. ETAPAS CATALÍTICAS DO SISTEMA FAS-I E FAS-II PARA A BIOSÍNTESE DE ÁCIDOS MICÓLICOS



Fonte: Adaptado de Schroeder *et. al.* (2002); Pan e Tonge (2012).

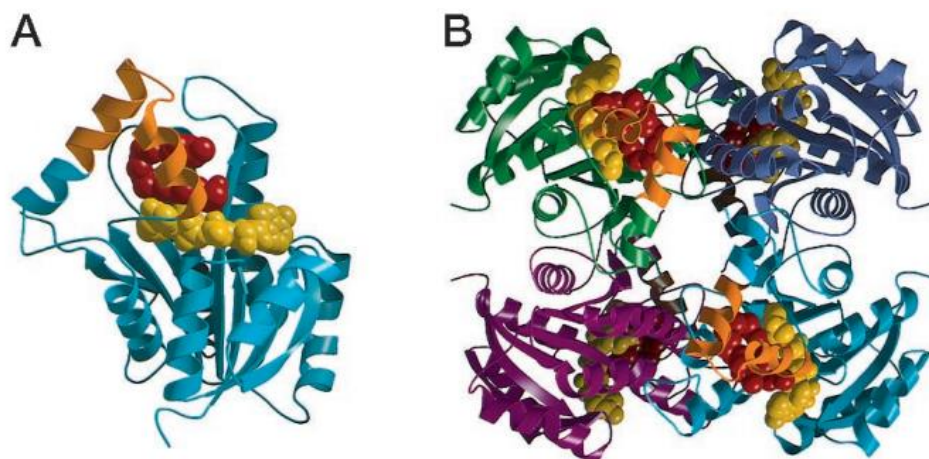
Nota: O sistema FAS-I realiza a síntese de C_{16:0}/C_{18:0} e C_{24:0}/C_{26:0}. Os produtos C_{24:0}/C_{26:0} irão compor a α -ramificação. Os produtos de C_{16:0}/C_{18:0} serão substratos para a síntese de ácidos micólicos pelo sistema FAS-II. Os ácidos graxos (C_{16:0}/C_{18:0}) produzidos pelo FAS-I sofrem a ação de uma transacilase, levando à formação de acil-CoAs. Esses são utilizados pela MtFabH para o início do seu alongamento pelo sistema FAS-II.

Legenda: FAS-I e II (Fatty acid synthase), CoA (Coenzima A), MtFabH (β -ketoacyl synthase, ou KasA/KasB), MabA (β -ketoacyl reductase - KAR), DE (β -hydroxyacyl desidratase), InhA (*trans*- Δ^2 -enoil-ACP (CoA)).

Resumidamente, o sistema FAS-I sintetiza precursores acil-CoA que são condensados com malonil-ACP. O produto dessa condensação sofrerá reações de alongamento até uma cadeia entre 50 - 60 carbonos pelo sistema FAS-II. Isso indica que o sistema FAS-II utiliza os produtos do FAS-I como iniciadores. Por fim, os produtos do FAS-II poderão formar a ramificação longa de ácidos meromicólicos, os quais irão compor a cadeia carbônica principal dos ácidos micólicos (Esquema 1).

O produto do gene *inhA* (Rv1484), em *M. tuberculosis*, é a proteína 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (InhA), com massa molecular de 28.527 Da, com ponto isoelétrico de 6,1 e composta por 269 aminoácidos que faz parte do sistema FAS-II (*Tuberculist*). Essa enzima pertence à superfamília das desidrogenases/redutases de cadeia curta (SDR - do inglês *Short-chain dehydrogenases/reductases*). A principal característica dessa família de enzimas é a topologia da cadeia polipeptídica, onde cada subunidade consiste em um único domínio com um núcleo central o qual contém um *fold* de Rossmann, confirmando a presença de um sítio de ligação para o cofator NADH (Rozwarski *et. al.*, 1999) (Figura 4, código no PDB – do inglês *Protein Data Bank* - 1BVR). Estudos de cromatografia analítica de exclusão por tamanho sugerem que a proteína é um homotetrâmero em solução (Oliveira *et. al.*, 2006), organização que é idêntica aos homotetrâmeros encontrados para as estruturas das ENR de *E. coli* e *B. napus* (Baldock *et. al.*, 1996; Rafferty *et. al.*, 1995; Rozwarski *et. al.*, 1999).

FIGURA 4. CADEIA POLIPEPTÍDICA DA INHA



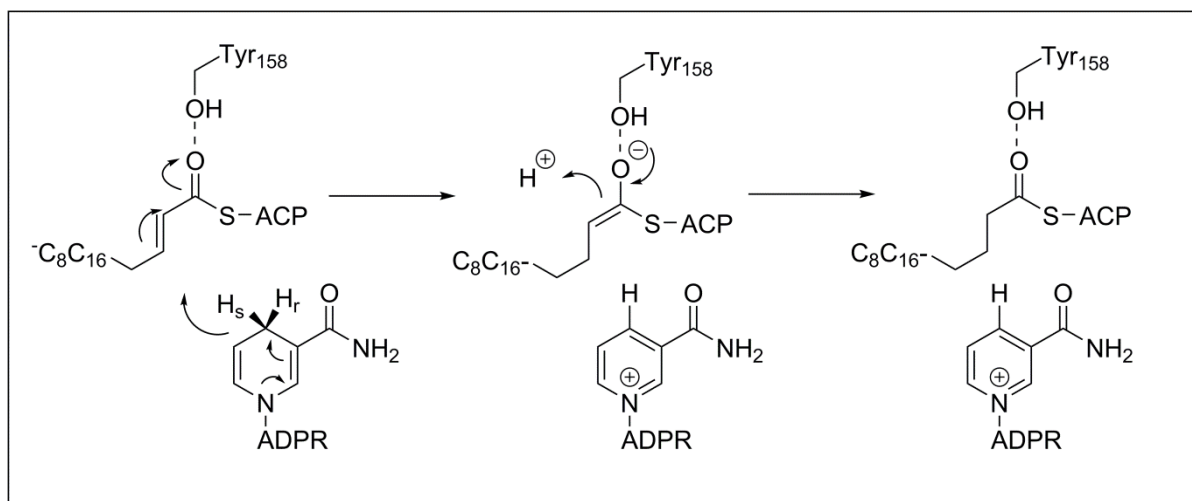
Fonte: Rozwarski *et. al.*, 1999 (Código PDB: 1BVR)

Legenda: (A) Subunidade da InhA (cor ciano) com destaque para o *loop* de ligação do cofator NADH (cor laranja) o qual compreende os resíduos 196-219. A molécula de NAD⁺ está representada em amarelo e o substrato ácido graxo, com cadeia de 16 carbonos, em vermelho. (B) Homotetrâmero da InhA, onde cada subunidade está representada de uma cor diferente (ciano, azul, verde e roxo). As moléculas de NAD⁺ e do ácido graxo estão representadas na mesma cor que em A.

As enzimas pertencentes à família das SDR são descritas por apresentar uma tríade de aminoácidos catalítica no seu sítio ativo. Acredita-se que a tríade catalítica da InhA seja composta pelos resíduos de aminoácidos de fenilalanina 149 (Phe¹⁴⁹), tirosina 158 (Tyr¹⁵⁸) e lisina 165 (Lys¹⁶⁵). Dados de alinhamento de sequência de enzimas homólogas demonstram que Tyr¹⁵⁸ e Lys¹⁶⁵ da InhA são aminoácidos conservados na família de enoil-redutases (Parikh, *et. al.*, 1999). Na InhA, a localização da Lys¹⁶⁵ é muito parecida entre as enzimas da classe das SDR, sugerindo que sua função é de manter o cofator NADH no lugar. Por outro lado, a função do resíduo de Tyr¹⁵⁸ parece estar relacionada com a interação direta com o substrato.

A InhA catalisa a redução da ligação dupla (*trans*) entre a posição C2 e C3 de substratos enoil-éster de cadeia longa (*trans*- Δ^2 -enoil-ACP) a sua forma saturada (Esquema 2). Dados da literatura demonstraram que a enzima é capaz de reconhecer tanto os substratos ligados a proteína carregadora de acil (ACP), quanto ligado a coenzima-A (CoA), por isso é denominada 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase (Quémard, 1995). O mecanismo cinético proposto envolve a transferência estereoespecífica do hidreto da posição 4S do cofator NADH à posição C3 do substrato *trans*- Δ^2 -enoil-ACP, com conseqüente oxidação do NADH à NAD⁺ seguido pela protonação do C2 do enol(ato) intermediário (Quémard *et. al.*, 1995; Parikh *et. al.*, 1999) (Esquema 2).

ESQUEMA 2. MECANISMO CATALÍTICO PROPOSTO PARA 2-TRANS-ENOIL-ACP REDUTASE DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS



Fonte: Adaptado de: Quémard *et. al.*, (1995); Rozwarski *et. al.*, (1999).

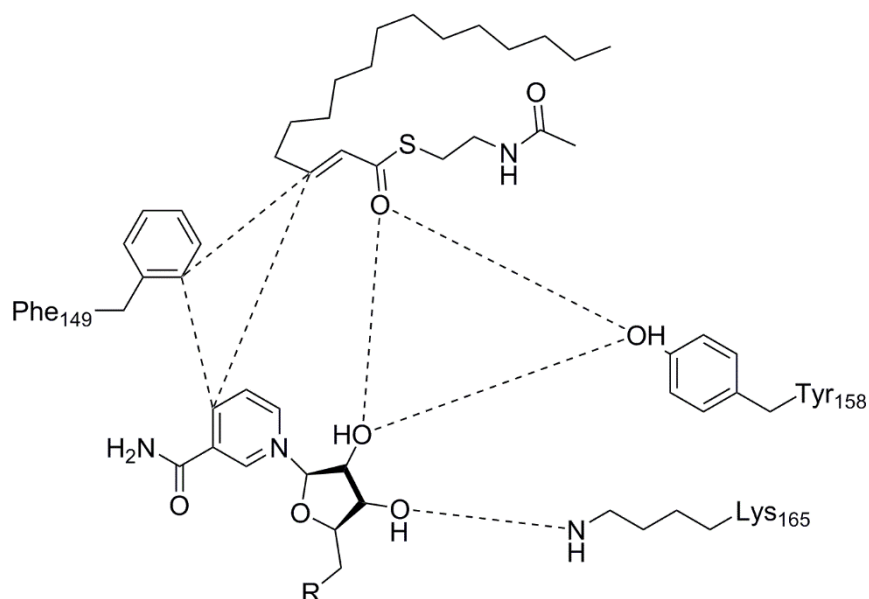
Em relação aos resíduos de aminoácidos que compõem a tríade catalítica, dados de cristalografia de raios x demonstram a interação da cadeia lateral da Tyr¹⁵⁸ com o oxigênio carbonílico do substrato enoil-éster (Rozwarski *et. al.*, 1999) (Figura 5). A resolução da

estrutura cristalográfica de um complexo ternário inativo (PDB 1BVR), composto pela InhA, NAD⁺ e um substrato enoil de 16 carbonos, revela que com a ligação do substrato enoil há uma rotação de 60° entre as ligações dos carbonos α e β (C α - C β) da Tyr¹⁵⁸ que possibilita a ligação de hidrogênio entre a hidroxila da cadeia lateral do aminoácido e a carbonila do substrato (Rozwarski *et. al.*, 1999). O efeito isotópico inverso do solvente ($D_2^O V/K_{DD-CoA}$) observado para o substrato enoil-éster pode estar relacionado com esta mudança conformacional da Tyr¹⁵⁸ no sítio ativo (Parikh *et. al.*, 1999). Estudos de efeitos isotópicos primários indicam que a Tyr¹⁵⁸ não funciona formalmente como um doador de próton na reação catalisada pela InhA. Esse resíduo atua, provavelmente, como um catalisador eletrofílico, estabilizando o(s) estado(s) de transição para a transferência do hidrogênio (Esquema 2) (Parikh *et. al.*, 1999). Entretanto, a fonte de próton para redução do C2 do substrato acil graxo ainda não está clara. Parece não existir resíduos polar/ionizáveis próximos o suficiente da posição C2, sugerindo que o próton pode vir do solvente (Esquema 2) (Rozwarski *et. al.*, 1999).

Através de mutagênese sítio-direcionada foi possível observar que o resíduo de Lys¹⁶⁵ tem função primordial de ligação do cofator NADH (Parikh *et. al.*, 1999). Essa observação é suportada pela estrutura cristalográfica da InhA, complexada com NADH, onde o grupamento amino da Lys¹⁶⁵ faz ligações de hidrogênios com os as duas hidroxilas da ribose do NADH (Dessen *et. al.*, 1995). Estudos de dinâmica molecular também constataram essas interações (Schroeder *et. al.*, 2005). Essas ligações de hidrogênio entre a cadeia lateral da Lys¹⁶⁵ e as hidroxilas do NADH são consistentes com interações observadas em outros membros da SDR (Rozwarski *et. al.*, 1999) (Figura 5).

A Phe¹⁴⁹ parece funcionar como âncora do fragmento nicotinamida do NADH para transferência do hidrogênio para o substrato enoil-éster (Dias *et. al.*, 2007). Na estrutura cristalográfica (código PDB: 1ENY) da InhA complexada com NADH, a cadeia lateral benzílica da Phe¹⁴⁹ parece estar localizada acima do anel nicotinamida (Dessen *et al.*, 1995). A proximidade da Phe¹⁴⁹ ao anel nicotinamida do NADH sugere que esse resíduo possa estar envolvido no controle da conformação da ligação do cofator (Bell *et. al.*, 2007). Dados de mutagênese sítio-direcionada acoplados com efeitos isotópicos cinéticos demonstraram que a Phe¹⁴⁹ reduz a energia do estado de transição através da correta orientação do cofator para a sua conformação mais ativa, facilitando a transferência do hidrogênio 4S (Bell *et. al.*, 2007).

FIGURA 5. TRIÁDE CATALÍTICA DA INHA



Fonte: Adaptado de Rozwarski *et. al.*, (1999)

Nota: As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio.

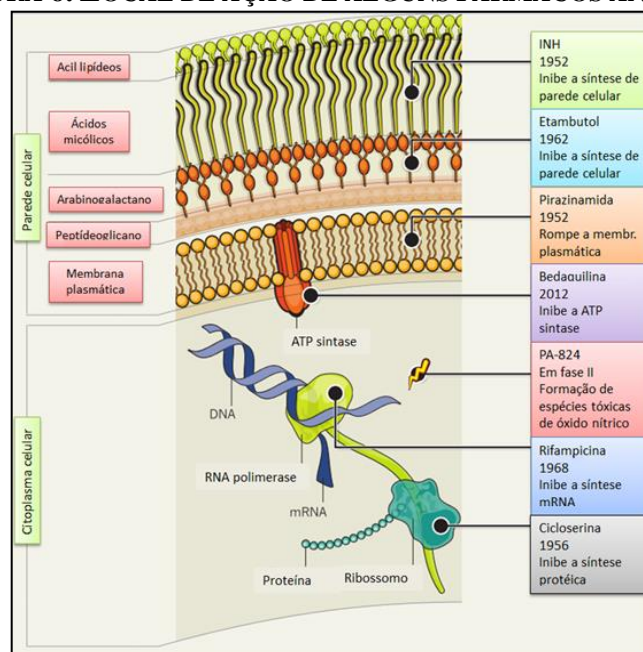
Em relação ao que se sabe sobre o mecanismo cinético, efeitos isotópicos primários do cofator (4*S*)-NADD e (4*R*)-NADD demonstraram a estereoespecificidade da transferência do próton do cofator, sendo que é o hidreto da posição 4*S* que é transferido para a posição C3 do substrato enoil-éster (Esquema 2) (Quémond *et. al.*, 1995). Estudos de efeitos isotópicos primários, utilizando o substrato (4*S*)-NADD, são consistentes com o fato da InhA apresentar ordem randômica de adição dos substratos (Parikh *et. al.*, 1999). Em 2010, Vasconcelos e colaboradores demonstraram que o substrato alternativo para a InhA, 2-*trans*-dodecenoil-CoA, é capaz de se ligar na forma livre da enzima, corroborando com a ordem randômica de adição dos substratos (Vasconcelos *et. al.*, 2010). A redução do substrato enoil-éster ocorre via mecanismo denominado “por etapas” (em inglês denominado *stepwise*) onde a transferência do hidreto 4*S* precede a protonação. Acredita-se que o estado de transição para a transferência do hidreto e a protonação do enol(ato) intermediário sejam ambas etapas limitantes da velocidade da reação (Parikh *et. al.*, 1999). Enquanto a etapa sensível ao solvente isotópico (efeito isotópico do solvente – D₂O) é assumida por ser a quebra do enol(ato) intermediário pela protonação do C2 (Parikh *et. al.*, 1999) (Esquema 2).

A atividade enzimática catalisada pela InhA corresponde à última etapa no ciclo de alongamento de dois carbonos na via de biossíntese de ácidos graxos (Marrakchi *et. al.*, 2000). A preferência da enzima por substratos de cadeia carbônica longa (C > 12) e o fato de inibidores da atividade da InhA bloquearem a síntese de ácidos micólicos confirmam o seu envolvimento

no alogamento de ácidos graxos pelo sistema FAS-II de micobactérias (Quémard *et. al.*, 1995; Marrakchi *et. al.*, 2000). A InhA tem sequência de aminoácidos similar a outras duas ENR, a proteína de *Escherichia coli* (*E. coli*) (40% de similaridade) (Banerjee *et. al.*, 1994) e a proteína de *Brassica napus* (*B. napus*) (23% de similaridade) (Kater *et. al.*, 1991; Fawcett *et. al.*, 1994).

A primeira identificação da enzima InhA como alvo de fármacos foi realizada por Jacob e colaboradores. Os autores observaram mutações no gene *inhA* em isolados clínicos resistentes à isoniazida (INH) e identificaram que uma mutação pontual (a troca da serina na posição 94 por uma alanina) foi capaz de conferir resistência à INH e à etionamida em *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Banerjee *et. al.*, 1994; Dessen *et. al.*, 1995). Além disso, a inativação do gene *inhA* acarreta o acúmulo dos produtos finais do sistema FAS-I (C₂₄) e leva à morte de *M. smegmatis* por lise celular (Vilchère *et. al.*, 2000). A InhA é o alvo anti-TB mais bem validado, logo é a enzima da via de biossíntese de ácidos micólicos mais explorada na busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da TB.

Tendo em vista que os ácidos micólicos têm papel fundamental na composição da parede celular das micobactérias, inibidores de proteínas envolvidas nos sistemas FAS-I e II podem ser considerados potenciais agentes antimicobacterianos. A figura 6 mostra os locais de ação de alguns medicamentos anti-TB (Maxmen, 2013). Nesta figura, é importante destacar o local de ação da INH, fármaco de primeira-linha do tratamento da TB, descrita como inibidor da síntese da parede celular em *M. tuberculosis* (Figura 6).

FIGURA 6. LOCAL DE AÇÃO DE ALGUNS FÁRMACOS ANTI-TB

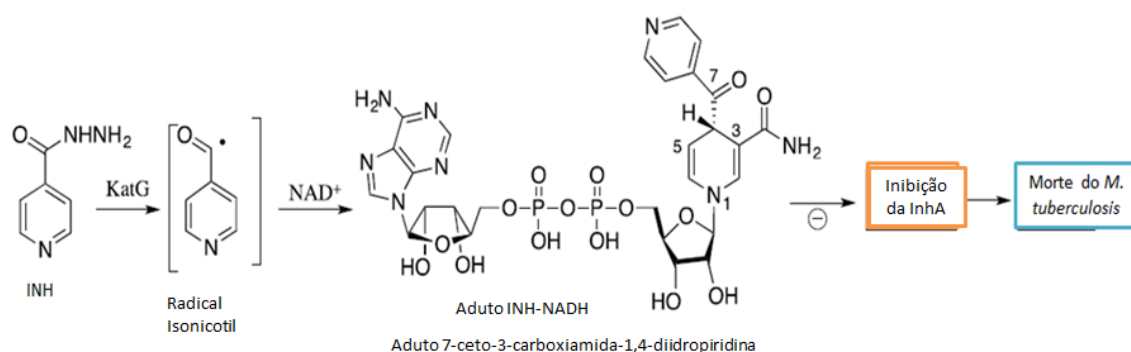
Fonte: Adaptado de Maxmen (2013).

O bacilo *M. tuberculosis* é particularmente sensível à INH, na faixa de 0,02 - 0,2 $\mu\text{g/mL}$; entretanto, cepas resistentes foram reportadas logo após a sua introdução na terapêutica (Middlebrook, 1952). Apesar da potente atividade contra o bacilo em replicação, a INH apresenta ação limitada contra o bacilo na forma latente. Diversos estudos vêm demonstrando que o mecanismo de ação da INH está correlacionado com a inibição da atividade enzimática da InhA (Winder e Collins, 1970; Takayama *et. al.*, 1972; Takayama *et. al.*, 1975; Davidson *et. al.*, 1979; Wheeler e Anderson, 1996; Mdluli *et. al.*, 1996), porém seu mecanismo molecular ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que a INH é um pró-fármaco e, portanto, não interage diretamente com a InhA. A INH deve ser convertida pela catalase peroxidase (KatG), codificada pelo gene *katG*, em intermediários isonicotil hipotéticos, principalmente eletrofílicos (Johnsson e Schult, 1994; Rozwarski *et. al.*, 1998). Essas espécies radicalares reagem covalentemente com o NADH celular resultando em um aduto isonicotinoil-NADH (INH-NAD(H)) (Esquema 3). Esse aduto INH-NAD(H) é descrito como inibidor competitivo *slow tight binding* da InhA, com uma constante de inibição global de $0,75 \pm 0,8$ nM (Rawat *et. al.*, 2003). Sua interação com a enzima resulta na interrupção da biossíntese dos ácidos micólicos e conseqüente morte da micobactéria (Esquema 3) (Quémard *et. al.*, 1995; Johnsson *et. al.*, 1995; Quémard *et. al.*, 1996; Takayama *et. al.*, 1972). É importante ressaltar que essas espécies radicalares são formadas apenas durante a fase de replicação da bactéria, ou seja, em condições

aeróbicas. Por outro lado, quando em estado latente (anaerobiose) da bactéria, a INH não é eficaz.

Ainda que esse mecanismo seja amplamente aceito, ele sozinho não explica nem o comportamento singular da molécula da INH dentro do bacilo nem os diferentes mecanismos de resistência relacionados a esse fármaco (Bernardes-Génisson *et. al.*, 2013). Além disso, existem dúvidas em relação ao local onde ocorre a reação entre o radical isonicotinoil e o NADH: dentro da KatG, dentro da InhA ou em solução? (Chollet *et. al.*, 2015). Finalmente, a forma química do fragmento piridina do nucleotídeo que reage com a forma ativada da INH também precisa ser elucidada (Chollet *et. al.*, 2015).

ESQUEMA 3. ATIVAÇÃO DA INH PELA FORMAÇÃO DO ADUTO INH-NAD PELA AÇÃO DA KATG



Fonte: Adaptado de Bernardes-Génisson, *et. al.* (2013).

A necessidade de ativação da INH facilitou o desenvolvimento de cepas resistentes a sua atividade bactericida. Mutações em pelo menos cinco genes distintos (*katG*, *inhA*, *ahpC*, *kasA* e *ndh*) estão correlacionadas com a resistência ou uma menor susceptibilidade à INH (Vilchèze *et. al.*, 2000; Escalante *et. al.*, 1998). Em relação ao gene *katG* deleções ou mutações *missense* são encontrados em cerca de 25 - 50% de isolados clínicos em *M. tuberculosis* resistentes à INH (Heym e Cole, 1992; Cockerill *et. al.*, 1995; Heym *et. al.*, 1995; Musser *et. al.*, 1996). Mutações nos genes da *katG* e *inhA* são contabilizadas em aproximadamente 75% dos casos de *M. tuberculosis* resistente à INH (Bernardes-Génisson, *et. al.*, 2013).

Apesar do decréscimo nas taxas de mortalidade e prevalência de TB entre os anos de 1990 e 2013, a TB ainda é considerada uma pandemia. O aumento considerável de cepas resistentes aos fármacos disponíveis, o que está correlacionado com o insucesso no tratamento e manutenção da doença, acentua a importância da necessidade de desenvolver novas alternativas terapêuticas para essa doença.

Enzimas da via de biossíntese dos ácidos micólicos são consideradas alvos atrativos para o desenvolvimento de fármacos anti-TB. Mais especificamente, alguns fatores destacam a proteína InhA como um alvo promissor: (i) foi identificada e validada como alvo de fármacos (ii) a grande maioria das mutações encontradas nos isolados clínicos resistentes à INH estão relacionados com a atividade da KatG; (iii) somente uma ENR é encontrada em *M. tuberculosis*, diferentemente de outras enzimas do sistema FAS-II bacteriano; (vi) a especificidade ao substrato de cadeia longa distingue a enzima de *M. tuberculosis* da ENR de outros organismos, como a enoil-ACP redutase componente do sistema FAS-I de humanos (Banerjee *et. al.*, 1994; Dessen *et. al.*, 1995; Rozwarski *et. al.*, 1999).

A validação da InhA como potencial alvo terapêutico no tratamento da tuberculose deslocou as atenções da comunidade científica para a busca de novos compostos capazes de inibir sua atividade catalítica. Essas abordagens procuram encontrar uma nova entidade química capaz de contornar os mecanismos de resistência desenvolvidos pelo patógeno bacteriano contra a INH. Por outro lado, a análise da cinética enzimática deve ser uma prioridade quando se busca a descoberta de fármacos baseados na função de alvo específicos, pois compostos que atuam em enzimas devem ser planejados levando em consideração o modo de ação enzimática (Robertson, 2007). Os itens abaixo salientam a utilização da InhA como alvo para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento da TB:

1) A InhA é considerada uma proteína "*druggable*": um composto químico com ação inibitória tem acesso à enzima dentro da célula, reduz a sua atividade, e este leva ao efeito fisiológico desejado (morte do patógeno). Além disto, a InhA apresenta características estruturais que propiciam a otimização de compostos químicos com atividade inibitória (e/ou melhoria dos parâmetros de farmacocinética) tais como: sítio de tamanho razoável (grande), relativamente isolado do solvente (*enclosure*), hidrofóbico com pouco caráter hidrofílico (*unexceptional hydrophilicity*), isto é, sítios de elevada polaridade são os que possuem menor probabilidade de serem *druggable*.

2) Além disto, um bom alvo molecular deve ter, preferencialmente, a estrutura tridimensional elucidada para facilitar o desenho de fármacos (*structure-based drug design*). A InhA satisfaz plenamente este quesito por ter a sua estrutura tridimensional solucionada por cristalografia de raios x.

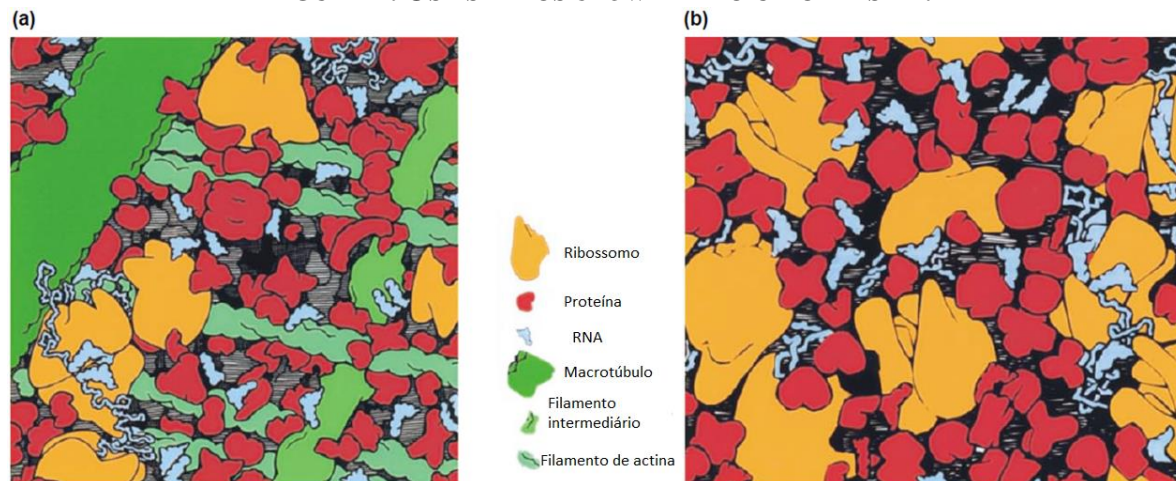
3) Outra característica importante é que há um método direto e contínuo para a determinação da sua atividade biológica *in vitro* o que facilitaria determinações de constantes de inibição e, inclusive, iniciativas de triagem de alto desempenho.

4) Embora aqui citado por último, mas de extrema importância, a InhA é um alvo validado (foi demonstrado que desempenha um papel vital no crescimento do *M. tuberculosis* e seu modo de ação é conhecido) e a sua inibição resulta na morte do bacilo.

1.3. *Macromolecular crowding*

Diversos fatores tornam o ambiente intracelular biológico *in vivo* diferente dos tampões diluídos utilizados em experimentos *in vitro*. O meio intracelular contém elevada concentração de macromoléculas solúveis, como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, os quais ocupam uma fração significativa do volume total intracelular (tipicamente 20-30%) (Figura 7) (Ellis, 2001). Esse meio é denominado “*crowded*” (preenchido, povoado) ou com elevado volume de ocupação. Em eucariotos o meio biológico é estruturado pela presença de macromoléculas como microtúbulos, filamentos de actina e F-actina (Figura 7) (Zimmerman e Minton, 1993). Todas essas macromoléculas solúveis e estruturais, que não participam diretamente de reações específicas, são denominadas partículas de “*background*”. Dessa forma, o ambiente intracelular real é muito diferente daquele explorado na prática laboratorial.

FIGURA 7. OS ESTADOS *CROWDED* DO CITOPLASMA.



Legenda: a) Célula eucariótica; (b) Célula de *Escherichia coli*. **Fonte:** Adaptado de Ellis (2001).

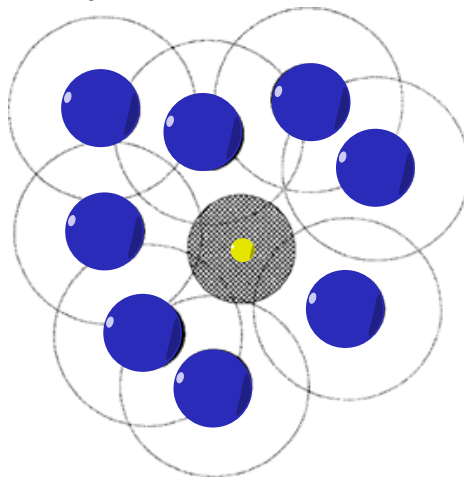
A presença dessas macromoléculas afeta a quantidade de água livre no ambiente intracelular, bem como o volume disponível para outras moléculas. Como resultado, consequências termodinâmicas oriundas da indisponibilidade de volume serão observadas. Chama-se “volume excluído” aquele volume que deixa de ser disponível para as moléculas de soluto pela presença de partículas de *background* (Zimmerman e Minton, 1993). Dessa forma, o *crowding* macromolecular é resultado de diferentes fatores, dentre os quais destacamos os efeitos do

volume excluído nas propriedades energéticas e de transporte de macromoléculas dentro de uma solução contendo elevadas frações de partículas de *background* (Zhou *et. al.*, 2008).

1.3.1 O fenômeno do volume-excluído

Visto que duas macromoléculas não podem ocupar o mesmo lugar no espaço, estas irão se repelir mutuamente devido ao impedimento estérico. De fato, em soluções *crowded* certos espaços intracelulares estão indisponíveis em decorrência dessa repulsão. Conseqüentemente, tanto as partículas de *background* quanto as partículas de interesse (partícula *probe*) serão menos randomicamente distribuídas, diminuindo, assim, a entropia da solução *crowded*. O decréscimo da entropia aumenta a energia livre do soluto, aumentando seu potencial químico (Ralston, 2005). Portanto, a atividade termodinâmica de proteínas em solução é substancialmente alterada pela adição de macromoléculas não reativas que ocupam espaço na solução (Figura 8). Dentre as conseqüências energéticas resultantes dos efeitos na atividade termodinâmica estão as possíveis alterações na estrutura terciária e/ou quaternária de proteínas, seus estados de agregação, solubilidade e a cinética de reações envolvendo proteínas como reagentes ou catalisadores (Minton, 1983).

FIGURA 8. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM AMBIENTE *CROWDED*.



Fonte: Adaptado de Zimmerman (1993). **Nota:** Partículas de *background*: em azul; Partícula *probe*: amarelo; O volume excluído pela partícula de *background* é representado pelos círculos ao redor dessas. Esse será o volume que deixa de ser disponível para as moléculas de soluto pela presença de partículas de *background*. A região destacada ao redor da partícula *probe* é o volume disponível para essa. Logo, no ambiente *crowded* o volume acessível para a partícula teste é menor do que aquele em soluções diluídas.

Como nas soluções diluídas as partículas de *background* estão ausentes, os efeitos do volume excluído não são considerados. Nessas soluções, ditas ideais, a energia livre parcial de um componente i da solução depende da sua concentração (equação 1). Onde μ_i é o potencial químico do componente i , μ_i° é o potencial químico no estado padrão, c_i é concentração molar, R é constante dos gases e T é temperatura absoluta.

$$\mu_i^{ideal} = \mu_i^\circ + RT \ln c_i \quad (1)$$

O aumento da energia livre, decorrente do volume excluído, pode ser considerado levando-se em consideração a atividade termodinâmica das moléculas (equação 2). Onde α_i é a atividade termodinâmica ($\alpha_i = \gamma_i c_i$) e γ_i é o coeficiente de atividade.

$$\mu_i^{real} = \mu_i^\circ + RT \ln \alpha_i = \mu_i^\circ + RT \ln c_i + \mu_i^\circ + RT \ln \gamma_i \quad (2)$$

O coeficiente de atividade leva em consideração o desvio do comportamento ideal das moléculas. Em soluções ideais, as interações entre as moléculas do soluto não são consideradas, logo $\gamma_i = 1$. Por outro lado, na presença de partículas de *background* o volume excluído aumenta a energia livre, o que implica $\gamma_i > 1$. Como resultado do aumento da atividade termodinâmica, processos determinados pela atividade serão aumentados. Espera-se que o volume excluído tenha efeitos significativos na estabilidade conformacional e propriedades estruturais de macromoléculas biológicas. Além disso, o *crowding* macromolecular poderá afetar equilíbrios biológicos, enovelamento de proteínas, ligação de pequenas moléculas, interações proteína-proteína e agregação patológica de proteínas (Kuznetsova *et. al.*, 2014, e referências citadas neste).

1.3.2 Efeitos do volume excluído no equilíbrio químico

O volume-excluído tende a favorecer as reações de associação através de dois principais efeitos: (i) em soluções *crowded* o coeficiente de atividade (γ_i) das moléculas de soluto tende a ser aumentado e, conseqüentemente, a sua atividade termodinâmica também. Dessa forma, as constantes de equilíbrio, expressas em termos da atividade termodinâmica, deverão ser maiores, favorecendo assim, processos de associação de macromoléculas; (ii) o evento de ligação é favorecido porque a redução do volume excluído, e concomitante aumento do volume disponível, diminuem a energia livre total da solução. Assim, o estado mais favorável é aquele que exclui o menor volume para as outras macromoléculas presentes (Ralston, 2005; Ellis, 2010). Dessa forma, o volume excluído favorece, por exemplo, a associação de monômeros, o

enovelamento de proteínas e ácidos nucleicos para formas mais compactas e a formação de agregados, como depósitos amiloides em doenças neurodegenerativas (Ellis e Minton, 2003).

1.3.3. Efeito do volume excluído na cinética enzimática

A atividade química de enzimas também deve ser afetada pelos efeitos do volume excluído, entretanto os efeitos tendem a ser complexos e relacionados com a natureza de cada reação em particular. A presença de partículas de *background* pode afetar a velocidade das reações enzimáticas dependendo dos processos limitantes da velocidade (Minton, 1998). Se o encontro entre os reagentes (enzima e substratos, por exemplo) é muito mais rápido do que a conversão do complexo ativado em produtos, então a reação é dita limitada pelo estado de transição. Nessa situação, o *crowding* deverá aumentar a abundância relativa do estado de transição e, por isso, a velocidade *forward* da reação. Por outro lado, se a velocidade de encontro entre os reagentes é pequena relativa à velocidade no qual o complexo de transição é convertido em produtos, então a reação é difusão limitada. O *crowding*, que afeta o movimento difusional, deverá reduzir a velocidade *forward* da reação. Finalmente, existem casos intermediários onde os dois tipos de comportamento poderão ser observados dependendo do volume de ocupação fracional das partículas de *background*. A velocidade *forward* da reação pode inicialmente aumentar, passando por um máximo, e então decair quando o agente de *crowding* está em elevada concentração (Minton, 1998; Minton, 2001).

Durante a catálise, o complexo do estado de transição pode ser expandido ou contraído. Em soluções *crowded* isso produzirá um aumento ou decréscimo, respectivamente, na energia de ativação, afetando a velocidade máxima da reação (Ralston, 2005). Além disso, a constante de Michaelis (K_m) também pode ser afetada. Acredita-se que se a associação do substrato com a enzima leva a formação de um complexo *ES* mais compacto, então o *crowding* irá aumentar a formação desse e, conseqüentemente, reduzir o valor do K_m (Ralston, 2005).

Finalmente, os efeitos do volume excluído na cinética enzimática estão relacionados com a natureza da reação e por isso é necessário avaliar esses efeitos para cada enzima. Os dados descritos na literatura estão relacionados com o sistema em estudo e divergem quanto aos efeitos observados. Por exemplo, os parâmetros catalíticos da multi-cobre oxidase de *Saccharomyces cerevisiae* (Fet3p) foram afetados pelo *crowding* macromolecular *in vitro* (Pozdnyakova & Wittung-Stafshede, 2010). Nesse estudo, diferentes concentrações dos agentes de *crowding* afetaram de maneira distinta a cinética da enzima, pois com baixas concentrações dos agentes os valores das constantes de Michaelis (K_m) e da constante catalítica (k_{cat}) para

ambos os substratos aumentaram. Por outro lado, em elevadas concentrações dos agentes de *crowding*, houve redução dos parâmetros cinéticos avaliados (Pozdnyakova & Wittung-Stafshede, 2010). Agentes de *crowding* já foram descritos como responsáveis pelo aumento na atividade catalítica de uma glucosidase II de retículo endoplasmático (Totani, *et. al.*, 2008). Ademais, tanto o k_{cat} quanto o K_m da hexoquinase foram reduzidos na presença de elevadas concentrações de BSA como agente de *crowding* (Olsen, 2006). Similarmente, os valores de K_m e k_{cat} dos substratos NADH e piruvato, na reação catalisada pela L-lactato desidrogenase foram reduzidos pela presença de elevadas concentrações de dextran (Balcells, *et. al.*, 2014). Dessa forma, o *crowding* macromolecular deve ser estudado para cada sistema em específico e as possíveis alterações nos parâmetros cinéticos devem ser cuidadosamente analisadas para correto entendimento das mudanças nos parâmetros cinéticos observadas.

1.3.4. Abordagens que mimetizam os efeitos do volume excluído

É possível avaliar os efeitos do *crowding* em reações de associação de macromoléculas ou na atividade cinética de enzimas pela adição de elevadas concentrações de macromoléculas que mimetizam o ambiente intracelular. Para isso, é comum o uso de polímeros ou polissacarídeos sintéticos que sejam solúveis em água e inertes em relação ao sistema estudado (Ellis, 2001). Agentes de *crowding* ideais devem apresentar massa molecular entre 50 000 – 200 000 Da, não ser propensos a auto-agregação e apresentar uma forma molecular que não torne a solução demasiadamente viscosa (Ellis, 2001). Entretanto, o critério mais importante é que o agente utilizado não interaja com o sistema em estudo, exceto por exclusão estérica. Na prática, é necessário o uso de uma variedade de agentes de *crowding* para reduzir o risco de observar efeitos causados por interações específicas. Além disso, é necessário garantir que os efeitos observados não sejam decorrentes de alterações no pH, da força iônica ou pressão osmótica da solução (Ellis, 2001). Os seguintes critérios são úteis para evitar a interpretação errônea dos efeitos do volume excluído (Zimmerman, 1993):

(i) O mesmo fenômeno deve ser observado em mais de um agente de *crowding*. O volume excluído é resultado de uma interação não específica entre as moléculas, por isso é preconizado o uso de diferentes agentes os quais devem apresentar efeitos similares no sistema em estudo. O uso de materiais de *background* contrastantes como polímeros hidrofílicos (polietilenoglicol, álcool polivinílico), polissacarídeos (ficoll, dextran) é uma alternativa preconizada na literatura;

(ii) O ambiente intracelular contém macromoléculas que ocupam entre 7 - 40% do volume total e por isso é necessário o uso de diferentes concentrações de agentes de *crowding*. Espera-

se que crescentes concentrações dos agentes de *crowding* causem significativo aumento no fenômeno do volume excluído.

(iii) Os efeitos do tamanho das partículas de *background* devem ser consistentes com o volume excluído: partículas com tamanho maior deverão causar efeitos mais pronunciados do que partículas menores, quando apresentarem a mesma densidade. Entretanto, quando partículas de *background* maiores apresentaram a mesma concentração em massa de partículas menores, estas últimas deverão apresentar efeitos mais significativos. Dessa forma, é importante utilizar agentes de *crowding* com diferentes massas moleculares.

(iv) Como controles poderão ser utilizados os monômeros ou oligômeros dos agentes de *crowding* escolhidos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desse trabalho é a avaliar os efeitos do *crowding* macromolecular na atividade enzimática da 2-*trans*-enoil-ACP (CoA) redutase de *M. tuberculosis*.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Parâmetros físico-químicos

- Determinar os valores de densidade das soluções contendo os agentes de *crowding*;
- Determinar a viscosidade, viscosidade específica e a viscosidade intrínseca das soluções contendo os agentes de *crowding*;
- Determinar os valores do raio hidrodinâmico e raio hidrodinâmico intrínseco dos agentes de *crowding* nas condições experimentais testadas;
- Calcular os valores do volume específico parcial e de ocupação fracional nas soluções contendo os agentes de *crowding*;

2.2.2. Parâmetros cinéticos

- Determinar as constantes cinéticas aparentes da *2-trans*-enoil-ACP (CoA), em espectrofotômetro, no tampão Pipes 100 mM pH 7;

- Determinar as constantes cinéticas aparentes da *2-trans*-enoil-ACP (CoA), em espectrofotômetro, na presença de diferentes concentrações dos seguintes agentes de *crowding*: ficoll 70, ficoll 400, dextran 70, PEG 6000 e do cosoluto sacarose;

2.2.3. Parâmetros termodinâmicos

- Determinar os parâmetros termodinâmicos de ativação para a *2-trans*-enoil-ACP (CoA) redutase em tampão Pipes 100 mM pH 7;

- Determinar os parâmetros termodinâmicos de ativação para a *2-trans*-enoil-ACP (CoA) redutase utilizando a concentração de 200 mg/mL dos agentes de *crowding*;

2.2.4. Estudos de dinâmica molecular

- Realizar simulações por dinâmica molecular da InhA em Pipes 100 mM pH 7 e na presença de 25 e 200 mg/mL de sacarose – Realizado em colaboração com: Dr. Osmar Norberto de Souza, Dr. Luís F. S. M. Timmers e Carlos S. Borja;

3. *Justificativa*

A TB é uma doença que alcançou proporções pandêmicas, causada predominantemente pelo *M. tuberculosis* e reportada em todos os países do mundo. Ainda que seja uma doença tratável e curável, a OMS estimou um surgimento de 9 milhões de novos casos no ano de 2015. Dentre os fatores que são considerados preocupantes em relação a TB devemos ressaltar: (i) os elevados índices de mortalidade em decorrência da patologia; (ii) a biologia complexa do bacilo, especificamente em termos da composição do seu envelope celular, o qual está relacionado com a resistência natural a alguns antibióticos, a virulência do bacilo, a habilidade de sobreviver e se replicar dentro dos macrófagos e a incapacidade de muitos antibióticos penetrarem no citosol do bacilo; (iii) o surgimento e a transmissão de cepas resistentes de TB, as quais exigem um regime de tratamento mais longo e diferenciado, com medicamentos de segunda-linha que são mais tóxicos, menos efeitos e mais caros. Esses itens são apenas alguns dos muitos elementos que fazem a TB ser considerada um problema emergencial de saúde pública global. Eles destacam a importância em estudar e desenvolver novas entidades químicas capazes de serem alternativas terapêuticas no combate da TB.

Enzimas são catalisadores biológicos que fazem a quebra de ligações covalentes, convertendo substratos específicos em produtos. A estrutura tridimensional das enzimas é otimizada para as transformações químicas que elas realizam. Isso as torna alvos diferenciados para fármacos e oferece oportunidade para o desenho de compostos que obtenham vantagens sobre o mecanismo catalítico (Robertson, 2007). Entretanto, o processo de descoberta de um novo fármaco, planejado para atuar como inibidor enzimático, é árduo. O progresso da catálise enzimática ocorre através de eventos de ligação, mudanças conformacionais, um ou mais estados de transição, intermediários de reação e liberação de produto(s). Todas essas etapas devem ocorrer com constantes de velocidade definidas (Robertson, 2005). Portanto, a descoberta e o desenvolvimento de novos compostos que tenham como alvo enzimas está relacionado com o entendimento do seu mecanismo cinético.

A enzima InhA de *M. tuberculosis* é alvo validado para fármacos anti-TB: é uma proteína considerada “*druggable*”, possui sua estrutura tridimensional elucidada com método direto e contínuo para a determinação da sua atividade biológica *in vitro*. Entretanto, a análise bioquímica dessa enzima ainda se faz necessária para melhor compreensão do seu mecanismo catalítico. Dentre os ensaios cinéticos que ainda devem ser executados, podemos destacar os estudos de *crowding* macromolecular.

O ambiente intracelular é um meio altamente concentrado onde as macromoléculas biológicas como proteínas, ácidos nucleicos, ribonucleoproteínas e polissacarídeos ocupam uma fração significativa (tipicamente 20-30%) do volume total (Ellis, 2001; Minton, 1983). Nesse meio *crowded*, interações não específicas podem resultar em mudanças nos parâmetros termodinâmicos (decréscimo na entropia, levando a um aumento na energia livre do soluto) e na cinética das reações catalisadas por enzimas (Ralston, 1990; Kuznetsova, *et. al.*, 2014). Essas alterações podem influenciar a velocidade de reações catalisadas por enzimas, afetar o equilíbrio químico oligomerização, enovelamento, interações proteína-proteína e estabilidade conformacional (Ralston, 1990; Kuznetsova, *et. al.*, 2014). Os efeitos do *crowding* macromolecular nas reações bioquímicas são complexos e usualmente relacionados a natureza de cada reação. Por isso, avaliar os efeitos do volume excluído nas reações químicas catalisadas por enzimas é importante para obter informações sobre a extrapolação bioquímicas *in vitro* e *in vivo*.

Devido a importância da InhA de *M. tuberculosis* na sua fisiologia e como um alvo “*druggable*” para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para combater a TB, a avaliação dos efeitos do *crowding* macromolecular nessa enzima é, nesse contexto, relevante. Para isso, a determinação de parâmetros cinéticos na presença de agentes de *crowding*, os quais mimetizam o ambiente intracelular, é uma abordagem que permitirá melhor compreensão dos efeitos do volume excluído na cinética da InhA. Dessa forma, esses estudos deverão ser úteis no desenvolvimento de modelos *in vitro* para ensaios da atividade enzimática da InhA, que deverá servir como suporte para iniciativas de triagem de novos candidatos a fármacos anti-tuberculose.

4. Procedimento Experimental

Com o intuito de facilitar a organização e dar maior entendimento acerca do procedimento experimental realizado nesse trabalho, esse item será dividido nas seguintes sessões, referentes aos objetivos específicos, a saber: (i) parâmetros físico-químicos para as soluções em estudo; (ii) parâmetros cinéticos para a reação catalisada pela InhA; (iii) parâmetros termodinâmicos para reação catalisada pela InhA; (iv) dinâmica molecular para InhA na ausência de agentes de *crowding* e na presença de 25 e 200 mg/mL de sacarose.

4.1. Geral

Os agentes de *crowding* ficoll 70, ficoll 400, dextran 70 e polietilenoglicol (PEG) 6000 foram selecionados para realização dos experimentos. As soluções estoques dos agentes de *crowding* foram preparadas em água Milli-Q, em uma concentração final de 400 mg/mL. Para os ensaios cinéticos o tampão Pipes 100 mM (concentração final) pH 7 foi utilizado (Quémard *et. al.*, 1995; Basso *et. al.*, 1998). É importante destacar que a adição dos agentes de *crowding* não afetou o pH da solução. Diferentes experimentos controle foram realizados para garantir a inexistência de possíveis interações específicas entre os agentes de *crowding* e os substratos. Para isso, o ensaio cinético (descrito abaixo) foi realizado em concentrações saturantes dos substratos e na ausência da enzima. Para essas leituras, não foram observados decréscimos na absorvância, sugerindo que as medidas de atividade observadas foram em decorrência da atividade enzimática. Todas as soluções foram misturadas manualmente antes das leituras.

4.2. Parâmetros físico-químicos

4.2.1. Medidas de densidade e viscosidade

As medidas de densidade e viscosidade foram realizadas utilizando o viscodensímetro SVM 3000 (Anton Paar). Esse equipamento foi disponibilizado pelo professor Dr. Jairton Dupont em seu Laboratório de Catálise Molecular (LAMOCA), localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todas as medidas foram realizadas em duplicata. Foram realizadas medidas de densidade e viscosidade das soluções na ausência e na presença dos agentes de *crowding* em diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 mg/mL) e em diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C).

4.2.2. Cálculo do volume específico parcial e do volume de ocupação fracional

A determinação da densidade nos permitiu obter os valores do volume específico nas soluções contendo os agentes de *crowding*. A medida do volume específico nos fornece o valor da mudança no volume total da solução pela adição de uma quantidade do soluto. Com uma correlação linear entre os valores de densidade e concentração do agente de *crowding*, a eq. 3 pode ser utilizada (Senske, *et. al.*, 2014; Wandrey, *et. al.*, 1999). Onde \bar{v} é o volume específico parcial (cm^3/g), ρ° é a densidade do solvente (g/cm^3), ρ é a densidade da solução contendo o agente de *crowding* (g/cm^3) e c é a concentração do agente de *crowding* na solução (g/cm^3).

$$\rho = \rho^\circ + (1 - \bar{v}\rho^\circ)c \quad (3)$$

Posterior à obtenção do volume específico parcial, foi possível determinar os volumes de ocupação fracional dos agentes de *crowding* na solução, os quais nos informam a fração do volume da solução que é ocupada pelo agente. Para sua determinação, levamos em consideração o volume total do ensaio enzimático da InhA (0,5 mL) e a concentração do agente de *crowding* (equação 4). Onde v é o volume final da cubeta (mL), m é massa (g) do soluto e $[AC]$ é a concentração do agente de *crowding* (g/mL). A multiplicação da massa obtida pelo volume específico parcial nos fornece o volume de ocupação fracional (mL).

$$[AC]v = m \quad \bar{v}m = \text{vol. de ocupação fracional} \quad (4)$$

4.2.3. Cálculos da viscosidade intrínseca, raio hidrodinâmico e raio hidrodinâmico intrínseco

Para obtenção uma estimativa do raio hidrodinâmico dos agentes de *crowding*, a viscosidade específica - η_{sp} (sem unidade) foi determinada pela equação 5:

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta^\circ}{\eta^\circ} \quad (5)$$

Onde η° é a viscosidade do solvente em g/cm^3 (solução de Pipes 100 mM pH 7.0, a 25°C), η é a viscosidade da solução (solução do agente de *crowding* na concentração desejada) em g/cm^3 (Halpern, 1997). Os termos η° e η são adimensionais e positivos. Para uma solução contendo N moléculas esféricas de soluto a relação entre a η_{sp} e o raio R (Halpern, 1997):

$$\eta_{sp} = \frac{10\pi R^3 c_m}{3m} \quad (6)$$

Onde c_m é a concentração em massa do soluto em solução (em g/mL ou g/cm³) e m é a massa molecular do soluto (em g/molécula). A η_{sp} é uma propriedade coligativa, pois seu valor depende da concentração do polímero na solução. A viscosidade intrínseca ($[\eta]$, em cm³ g⁻¹) é dada pela seguinte relação:

$$[\eta] \equiv \lim_{c_m \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c_m} \right) = \frac{10\pi R^3}{3m} \quad (7)$$

O limite da diluição infinita ($c_m \rightarrow 0$) é necessário para definir a viscosidade intrínseca do soluto (independente da concentração) em uma dada solução. Essa condição limitante é necessária para definir a viscosidade intrínseca ($[\eta]$ – equação 7) como a viscosidade específica reduzida (η_{sp}/c_m – equação 8) que depende da concentração do polímero devido a forças de cisalhamento entre a macromolécula dissolvida e o solvente do meio. A viscosidade específica reduzida pode ser definida por (equação 8):

$$\frac{\eta_{sp}}{c_m} = [\eta] + k[\eta]^2 c_m + k' c_m^2 \quad (8)$$

Onde k é a constante de Huggins (Halpern, 1997). A viscosidade intrínseca ($[\eta]$, em cm³/g) é uma propriedade intrínseca do soluto, denominada $10\pi R^3/3m$, e conseqüentemente não depende da quantidade de soluto presente na solução.

4.3. Parâmetros cinéticos

4.3.1. Expressão e purificação da 2-trans-enoil-ACP (CoA) redutase de *Mycobacterium tuberculosis*

A expressão e purificação da proteína recombinante foram realizadas conforme metodologia descrita na literatura (Quémard *et. al.*, 1995; Basso *et. al.*; 1998). O substrato 2-trans-dodecenoil-CoA (DD-CoA) foi sintetizado e purificado por HPLC em fase reversa, utilizando uma coluna 19 x 300 mm C₁₈ μ Bondapak (Waters Associates, Milford, MA), utilizando metodologia já descrita (Parikh *et. al.*, 1999). A concentração da InhA foi determinada espectrofotometricamente, diluindo 10 μ L da enzima purificada para 500 μ L de tampão Pipes 100 mM (pH 7) e utilizando um coeficiente de absorvidade molar de 29600 M⁻¹ cm⁻¹, em 282 nm (Grimsley, 2003).

4.3.2. Ensaio enzimático

A atividade da enzima recombinante foi medida através de ensaio espectrofotométrico contínuo (Basso *et. al.*, 1998). Resumidamente, os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro UV-2550 UV/visível (Shimadzu) equipado com suporte para o controle de temperatura na cubeta utilizada no ensaio (cubeta de quartzo de 0,5 mL). As medidas foram realizadas a 25°C em tampão Pipes 100 mM pH 7. A medida da atividade enzimática foi monitorada através de decréscimo da absorbância, em 340 nm, devido à oxidação do cofator NADH à NAD⁺ decorrente da conversão do substrato DD-CoA em sua forma saturada, durante 60 segundos. Os parâmetros cinéticos aparentes foram realizados para os substratos NADH e DD-CoA através de medidas de velocidade inicial em estado estacionário variando a concentração de NADH (5 – 300 μM) sob fixa concentração de DD-CoA (150 μM; $K_m \approx 46 (\pm 5) \mu\text{M}$) ou variando a concentração de DD-CoA (2,5 – 150 μM) sob fixa concentração de NADH (200 μM; $K_m \approx 66 (\pm 7) \mu\text{M}$) (Parikh *et. al.*, 1999). As reações foram iniciadas pela adição de 0,15 μM de proteína recombinante. Todas as medidas foram feitas ao menos em duplicatas.

Os dados das curvas hiperbólicas de saturação obtidas através das medidas de velocidade inicial quando um dos substratos foi variado e o outro mantido fixo foram analisados utilizando a equação de Michaelis-Menten (equação 9), onde v é a velocidade inicial, V é a velocidade máxima aparente, A é a concentração do substrato variando e K_m representa a constante aparente de Michaelis-Menten do substrato que está variando (Segel, 1975). O K_m representa a concentração de substrato na qual a reação enzimática atinge a metade da sua velocidade máxima (Copeland, 2000).

$$v = \frac{VA}{K_m + A} \quad (9)$$

Os valores de k_{cat} foram calculados a partir da equação 10, onde $[E]_t$ representa a concentração total de subunidades de enzima. O k_{cat} é referido como o número de *turnover* da enzima, pois define o número de eventos de *turnover* catalítico que ocorre por unidade de tempo, por isso é geralmente reportado s⁻¹ ou min⁻¹ (Copeland, 2000). Utilizando como substratos o NADH e o DD-CoA, o k_{cat} reportado para a InhA foi de $8,35 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ (Parikh *et. al.*, 1999).

$$k_{cat} = \frac{V}{[E]_t} \quad (10)$$

O mesmo procedimento experimental foi utilizado para as medidas de velocidade inicial na presença de diferentes concentrações dos agentes de *crowding* (25, 50, 100 e 200 mg/mL). Os dados de velocidade inicial para o cofator NADH foram analisados utilizando a equação 9. Entretanto, para o substrato DD-CoA, não foi observado o mesmo perfil hiperbólico para as curvas de saturação, mas sim um perfil sigmoidal. Dessa forma, utilizou-se a equação 11, onde $K_{0.5}$ é a constante correlacionada com o K_m , mas que também contém termos relacionados com os efeitos da ocupação do substrato em um sítio e a afinidade do substrato para outros sítios e n é o coeficiente de Hill (relacionado ao índice de cooperatividade) (Copeland, 2000).

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_{0.5}^n + [S]} \quad (11)$$

Em decorrência de limitações experimentais, possivelmente devido a elevada viscosidade do agente de *crowding*, as medidas para o dextran 70 na concentração de 200 mg/mL foram realizadas em um aparelho *stopped-flow* Applied Photophysics SX.18MV-R. Os experimentos foram realizados a 25 °C, com o aparelho no modo de absorvância e caminho óptico de 10 mm. Todas as medidas foram monitoradas durante 60 segundos no comprimento de onda de 340 nm e utilizando Pipes 100 mM pH 7 como tampão (concentração final). Antes de conduzir as medidas de velocidade inicial em estado estacionário, diferentes experimentos controle foram realizados para garantir confiabilidade dos dados. Para todos experimentos controle, oito eventos de mistura foram coletados, com 400 *data points* para cada um. A média de cinco diferentes leituras foi analisada como resultado final.

Controle 1 (para verificar possíveis interações dos substratos com o dextran 70): uma solução de NADH, DD-CoA e dextran 70 foi preparada em Pipes 100 mM pH 7. Essa solução foi colocada em uma das seringas do aparelho e foi misturada com uma solução de dextran e Pipes 100 mM pH 7 que foi colocada na segunda seringa do equipamento. Depois da mistura, as concentrações de NADH, DD-CoA e dextran 70 na *mixing chamber* foram de 200 μ M, 105 μ M e 200 mg/mL, respectivamente;

Controle 2 e 3 (para verificar possíveis interações dextran 70-NADH e dextran 70-DD-CoA): uma solução contendo dextran 70, NADH ou DD-CoA foi preparada em Pipes 100 mM pH 7 e colocado em uma das seringas do equipamento. Essas soluções foram misturadas com uma solução de dextran 70 em Pipes 100 mM pH 7.0, que foi colocada na segunda seringa. Esse experimento teve como objetivo verificar possíveis interações específicas entre os

substratos e o agente de *crowding*. As concentrações finais formam as mesmas descritas no controle 1. É importante destacar que esse experimento compreendeu dois controles distintos;

Controle 4 (para verificar efeitos de diluição do solvente e/ou agente de *crowding*): duas soluções idênticas de dextran 70 (200 mg/mL para concentração final) em Pipes 100 mM pH 7.0 foram colocadas nas duas seringas do equipamento e misturadas na *mixing chamber*.

4.4. Parâmetros termodinâmicos

4.4.1. Energia de Ativação

A energia de ativação (E_a) da reação química catalisada pela InhA foi determinada na ausência e na presença dos agentes de *crowding* (200 mg/mL). Para isso, medidas de velocidade inicial na presença de saturantes concentrações de NADH (200 μ M) e DD-CoA (105 μ M), em temperaturas variando entre 15 – 35 °C (288,15 – 308,15 K) e 15 – 40 °C para o PEG 6000 (288,15 – 313,15 K). A InhA foi incubada durante 5 minutos, para garantir a estabilidade da enzima, e as medidas foram realizadas sob as mesmas condições de ensaio espectrofotométrico descrito anteriormente. A E_a foi calculada a partir do gráfico de Arrhenius (E_a/R) fitando os dados na equação 12, onde R é a constante dos gases (8,314 J mol⁻¹ K⁻¹) e A é o produto da frequência de colisão (Z) e um fator estérico (p) baseado na teoria da frequência de colisão de cinética enzimática (Lonhienne *et. al.*, 2000). Para esse experimento, assumimos uma visão simplista para explicar um fenômeno complexo e que A é independente da temperatura.

$$\ln k_{cat} = \ln A - \left(\frac{E_a}{R}\right) \frac{1}{T} \quad (12)$$

A variação da entalpia (ΔH^\ddagger), entropia (ΔS^\ddagger) e energia livre de Gibbs (ΔG^\ddagger) de ativação foram estimadas utilizando as equações 13, 14 e 15, respectivamente, derivadas da teoria do estado de transição das reações enzimáticas (Lonhienne *et. al.*, 2000).

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT \quad (13)$$

$$\Delta G^\ddagger = RT \left(\ln \frac{k_B}{h} + \ln T - \ln k_{cat} \right) \quad (14)$$

$$\Delta S^\ddagger = \frac{\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger}{T} \quad (15)$$

Os valores de energia estão em kJ mol^{-1} , com k_{cat} em s^{-1} , para corroborar com as unidades das constantes de Boltzmann ($1,3805 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$) e de Planck ($6,6256 \times 10^{-32} \text{ J s}^{-1}$). Os valores dos erros de ΔG^\ddagger foram calculados utilizando a equação 16 (Lonhienne *et. al.*, 2000).

$$(\Delta G)_{Err} = \frac{RT(k_{cat})_{Err}}{k_{cat}} \quad (16)$$

A relação entre a viscosidade e a temperatura também foi determinada pelo gráfico de Arrhenius e os dados foram fitados na equação 12, onde k_{cat} foi substituído por η , a viscosidade da solução, e E_a foi substituído por E_η , o qual pode ser considerado a energia de ativação para fluidez viscosa do líquido (uma barreira energética que deve ser contornada por uma molécula “comprimida” por moléculas vizinhas, se ela estiver sendo movimentada em um meio viscoso). É importante destacar que E_a na equação 12 e 13 representa a energia de ativação da reação química catalisada pela InhA incluindo a energia para a fluidez viscosa do líquido (E_η).

4.5. Dinâmica Molecular

4.5.1. Simulações por dinâmica molecular da InhA em Pipes 100 mM e sacarose (25 e 200 mg/mL):

Para avaliar a influência dos efeitos do *crowding* na unidade biológica tetramérica da InhA, três diferentes sistemas macromoleculares foram construídos: (i) InhA em água; (ii) InhA em solução aquosa contendo 25 mg/mL de sacarose; e (iii) InhA em solução aquosa contendo 200 mg/mL de sacarose. Após a remoção dos ligantes, NADH e inibidor, a estrutura cristalográfica da InhA (PDB ID: 1P44 cadeia A) foi utilizada como conformação inicial (Kuo, *et. al.* 2003). Todos os sistemas foram simulados em uma caixa ortorrômbica de 10.0 Å de extensão a partir da superfície da proteína. As simulações de dinâmica molecular (DM) foram realizadas utilizando os campos de força ff99SB e GLYCAM-06EP implementados no programa Amber14 (Hornak, *et. al.*, 2006; Kirschner, *et. al.*, 2008; Case, *et. al.*, 2014). Todas as simulações foram realizadas utilizando um sistema NPT a 298,16 K com acoplamento Berendsen de temperatura (Berendsen, *et. al.*, 1994) e pressão constante de 1 atm. O algoritmo SHAKE (Ryckaer, *et. al.*, 1977) foi utilizado, com uma tolerância de 10^{-5} Å, para manter fixas todas as ligações contendo o átomo de hidrogênio, permitindo o uso de um intervalo de tempo de 2,0 fs para a integração das equações de movimento. Condições periódicas de contorno foram aplicadas, com interações eletrostáticas entre os átomos não-ligados avaliados com a versão CUDA do método partícula-malha Ewald (PME) (Salomon-Ferrer, *et. al.*, 2013). As interações Lennard-Jones foram avaliadas utilizando um *cut-off* atômico de 9 Å (de Souza &

Ornstein, 1999). Para melhor acomodar as moléculas de solvente ao redor da proteína, todos os sistemas foram submetidos a uma fase de relaxação no qual a estrutura da proteína foi gradualmente liberada a partir de um potencial de restrição de 20 kcal/mol por um período de 400 ps. Após aquecimento e equilíbrio, os sistemas procederam para fase de produção por outros 10 ns sem redesignação de velocidades. A cada 5,0 ps de análise foi feita uma coleta de dados. Para analisar as flutuações nos volumes das cavidades definida pelo sítio ativo da InhA, foi utilizado o programa trj_cavity (Paramo, *et. al.*, 2014) com espaçamento de grade de 1,4 Å e um volume mínimo de 500 Å³. O fator de temperatura foi determinado para avaliar a influência do ambiente de *crowding* na flexibilidade da proteína.

Devido ao tipo de abordagem experimental utilizada nos estudos de dinâmica molecular, esses ensaios não foram realizados nos outros agentes de *crowding* avaliados nesse trabalho.

6. Conclusões

Diferentemente da prática laboratorial, que utiliza meios diluídos com o intuito evitar interferentes, o meio intracelular é composto por diversas macromoléculas que exercem influência nesse ambiente. A abordagem experimental preconizada, quando se objetiva mimetizar o ambiente intracelular, é o uso de diferentes agentes de *crowding* sintéticos. Esses não podem interagir com o sistema em estudo, exceto via efeito do volume excluído.

Nesse trabalho, os resultados mostraram que os polímeros sintéticos amplamente utilizados ficoll 70, ficoll 400 e dextran 70 não apresentaram efeitos de *crowding* macromolecular significativos, nas concentrações utilizadas, na cinética da InhA de *M. tuberculosis*. Independentemente dos valores de raio hidrodinâmico intrínseco, viscosidade, volume de ocupação fracional e outros parâmetros físico-químicos aqui determinados, esses agentes de *crowding* não afetaram os parâmetros cinéticos aparentes e termodinâmicos de ativação da enzima. Por outro lado, um complexo efeito foi observado na presença do PEG 6000. Como efeito do *crowding* macromolecular esse agente afetou os parâmetros cinéticos aparentes para ambos os substratos de maneira independente da concentração. O gráfico de Arrhenius para o PEG 6000 apresentou uma curvatura que pode estar correlacionada com possíveis interações do polímero com o sistema em estudo. A sacarose, que foi utilizada como controle nos experimentos, reduziu os valores de k_{cat}/K_m para o NADH e k_{cat} para o DD-CoA de uma maneira concentração-dependente. Os resultados de dinâmica molecular sugerem que a InhA adota uma forma mais compacta na presença de sacarose, o que possivelmente tem efeitos nos parâmetros de cinética de estado-estacionário. É importante destacar que a presença dos agentes, nesse trabalho, parece alterar a abundância relativa dos diferentes confôrmeros da InhA em solução. Entretanto, os efeitos do volume excluído não afetaram a cinética da enzima em termos de facilitar a formação do complexo ativado ES^\ddagger , pois os valores de ΔG^\ddagger para todos os agentes de *crowding* testados foram similares ao tampão Pipes 100 mM.

Embora muitos sejam os dados na literatura sobre os efeitos do *crowding* macromolecular na cinética de enzimas e conformação/estrutura de proteínas (Kuznetsova, *et. al.*, 2014 e referências citadas nesse), poucos efetivamente consideram os parâmetros físico-químicos dos agentes de *crowding* utilizados. Esse trabalho demonstrou metodologias simples e factíveis de cálculos de determinação do volume de ocupação fracional, volume específico parcial, raio hidrodinâmico e raio hidrodinâmico intrínseco dos agentes de *crowding*. Esses parâmetros são

relevantes em termos de discussão dos efeitos de *crowding* macromolecular e poderão ser úteis em estudos futuros com outros sistemas enzimáticos.

Ademais, os efeitos do volume excluído são explicados, preferencialmente, em termos de contribuições entrópicas. As análises termodinâmicas dos efeitos do *crowding* macromolecular reportadas na literatura estão mais voltadas para efeitos conformacionais e estruturais em proteínas pela mimetização do ambiente intracelular (Kuznetsova, *et. al.*, 2014). Por outro lado, a teoria também descreve alterações nos parâmetros termodinâmicos de ativação na cinética de enzimas em decorrência do *crowding* macromolecular (Ralston, 2005). Entretanto, pelo que sabemos, ainda não há na literatura trabalhos que façam esse tipo de análise. Dessa forma, esse trabalho contribuiu como sendo pioneiro (ou um dos pioneiros) em analisar os efeitos de *crowding* macromolecular nos parâmetros termodinâmicos de ativação de uma enzima. Evidentemente que mais estudos devem ser realizados nesse campo para melhor compreensão dos efeitos observados, por exemplo, para o PEG 6000, ampliando-se a análise para contribuição entálpica nesse sistema e reanalisando os conceitos teóricos sobre os efeitos do volume excluído.

Como o meio intracelular é altamente *crowded*, os efeitos do *crowding* macromolecular nas reações bioquímicas devem ser obtidos para tentar minimizar as condições *in vivo*. Entretanto, como os componentes intracelulares são heterogêneos em relação à forma, tamanho e possíveis interações químicas macromoleculares, os experimentos *in vitro*, até o presente momento, não mimetizam perfeitamente o meio fisiológico *in vivo*. Não obstante, como o *crowding* macromolecular afeta a atividade biológica, características estruturais de proteínas, dinâmica molecular, auto-agregação de proteínas, empacotamento de proteínas e a habilidade de interagir com macromoléculas para formar complexos funcionais ou patogênicos, oligomerização de proteínas, agregação, enovelamento de proteínas, estabilidade estrutural, dinâmica conformacional e outros aspectos dos componentes celulares ele não pode ser ignorado (Kuznetsova, *et. al.*, 2014). Ademais, vem sendo proposto que a estrutura quinária deve ser implementada em modelos para estudar a função de proteínas em um ambiente celular *crowded* (Monteith, *et. al.*, 2015), e que mudanças polímero-induzidas nas propriedades de solventes aquosos devem ser levadas em consideração (Ferreira, *et. al.*, 2016). Finalmente, mais esforços são necessários para desenvolver um modelo *in vitro* para ensaio da atividade enzimática da InhA que deverá servir como suporte para campanhas de triagem de fármacos anti-tuberculose.

7. Referências

- AUMILLER, W. A., JR.; DAVIS, B. W.; HATZAKIS, E.; KEATING, C. D. Interactions Of Macromolecular Crowding Agents And Cosolutes With Small-Molecule Substrates: Effect On Horseradish Peroxidase Activity With Two Different Substrates. **J. Phys. Chem. B**, v. 118, p. 10624-10632, 2014.
- BALCELLS, C.; PASTOR, I.; VILASECA, E.; MADURGA, S.; CASCANTE, M.; MAS, F. Macromolecular Crowding Effect Upon In Vitro Enzyme Kinetics: Mixed Activation-Diffusion Control Of The Oxidation Of NADH By Pyruvate Catalyzed By Lactate Dehydrogenase. **J. Phys. Chem. B**, v. 118, p. 4062-68, 2014.
- BALDOCK, C.; RAFFERTY, J. B.; SEDELNIKOVA, S. E.; BAKER, P. J.; STUITJE, A. R.; SLABAS, A. R.; HAWKES, T. R.; RICE, D. W. A Mechanism Of Drug Action Revealed By Structural Studies Of Enoyl Reductase. **Science**, v. 274, n. 5295, p. 2107-2110, 1996.
- BANERJEE, A.; DUBNAU, E.; QUÉRMARD, 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, n. 5144, p. 227-230, 1994.
- BARRY III, C. E.; LEE, R. E.; MDLULI, K.; SAMPSON, A. E.; SCHROEDER, G. G.; SLAYDEN, R. A.; YUAN, Y. Mycolic Acids: Structure, Biosynthesis And Physiological Functions. **Prog. Lipid. Res.**, v. 37, n. 2-3, p. 143-179, 1998.
- BASSO, L. A.; ZHENG, R.; MUSSER, J. M.; JACOBS, W. R., JR.; BLANCHARD, J. S. Mechanisms of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymatic Characterization Of Enoyl Reductase Mutants Identified In Isoniazid-Resistant Clinical Isolates. **J. Infect. Dis.**, v. 178, p. 769-775, 1998.
- BELL, A.; STRATTON, C. F.; ZHANG, X.; NOVICHENOK, P.; JAYE, A. A.; NAIR, P. A.; PARIKH, S.; RAWAT, T.; TONGE, P. J. Evidence From Raman Spectroscopy That *InhA*, The Mycobacterial Enoyl Reductase, Modulates The Conformation Of The NADH Cofactor To Promote Catalysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, p. 6425-6431, 2007.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAMGUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular Dynamics With Coupling To An External Bath, **J. Chem. Phys.**, v. 81, p. 3684-3690, 1994.
- BERNARDES-GÉNISSON, V.; DERAËVE, C.; CHOLLET, A.; BERNADOU, J.; PRATVIEL, J. Isoniazid: An Update On The Multiple Mechanisms For A Singular Action. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, p. 4370-4385, 2013.
- BHOJANE, P. P.; DUFF JR. M. R.; PATEL H. C.; VOGT, M. E.; HOWELL, E. E. Investigation Of Osmolyte Effects On Fdh: Comparison With Other Dihydrofolate Reductases. **Biochemistry**, v. 53, p. 1330-1341, 2014.
- BLOCH, K. Fatty Acid Synthases From *Mycobacterium phlei*. **Method. Enzymol.**, v. 35, pt. B, p. 84-90, 1975.
- BRENNAN, P. J.; NAKAIDO, H. The Envelope Of Mycobacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 64, p. 29-63, 1995.

BRINDLEY, D. N.; MATSUMURA, S.; BLOCH, K; *Mycobacterium phlei* Fatty Acid Synthetase: A Bacterial Multienzyme Complex. **Nature**, v. 224, n. 5220, p. 666-669, 1969.

CASE, D. A.; BABIN, V.; BERRYMAN, J. T.; BETZ, R. M.; CAI, Q.; CERUTTI, D. S.; CHEATHAM, T. E.; III; DARDEN, T. A.; DUKE, R. E.; GOHLKE, H.; GOETZ, A. W.; GUSAROV, S.; HOMEYER, N.; JANOWSKI, P.; KAUS, J.; KOLOSSVÁRY, I.; KOVALENKO, A.; LEE, T. S.; LEGRAND, S.; LUCHKO, T.; LUO, R.; MADEJ, B.; MERZ, K. M.; PAESANI, F.; ROE, D. R.; ROITBERG, A.; SAGUI, C.; SALOMON-FERRER, R.; SEABRA, G.; SIMMERLING, C. L.; SMITH, W.; SWAILS, J.; WALKER, R. C.; WANG, J.; WOLF, R. M.; WU, X. AND KOLLMAN, P. A. AMBER 14, University of California, San Francisco, (2014).

CHEN, C.; LOE, F.; BLOCKI, A.; PENG, Y.; RAGHUNATH, M. Applying Macromolecular Crowding To Enhance Extracellular Matrix Deposition And Its Remodeling In Vitro For Tissue Engineering And Cell-Based Therapies, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, p. 277-290, 2011.

CHOLLET, A.; MOUREY, L.; LHERBET, C.; DELBOT, A.; JULIEN, S.; BALTAS, M.; BERNADOU, J.; PRATVIEL, G.; MAVEYRAUD, L. Crystal Structure Of The Enoyl-ACP Reductase From *Mycobacterium tuberculosis* (Inha) In The Apo-Form And Complex With The Active Metabolite Of Isoniazid Pre-Formed By Biomimetic Approach. **J. of Structure Biology**, v. 190, n. 3, p. 328–337, 2015.

COCKERILL, F. R. III; UHL, J. R.; TEMESGEN, Z.; ZHANG, Y.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D.; WILLIAMS, D. L.; KLINE, B. C. Rapid Identification Of A Point Mutation Of The *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase (KatG) Gene Associated With Isoniazid Resistance. **J. Infect. Dis.**, v. 171, n 1, p. 240-245, 1995.

COPELAND, R. A. Enzymes: A Practical Introduction To Structure, Mechanism, And Data Analysis, Wiley-VCH: New York, 2000, ch. 5, p. 120; ch. 12, p. 379.

CRONAN, J. E.; ROCK, C.O. *Escherichia coli* And Salmonella: Cellular And Molecular Biology. 2 ed. Washington: Ed. Neidhardt, F.C. ASM Press, 1996, p. 2822.

DAVIDSON, L. A.; TAKAYAMA, K. Isoniazid Inhibition Of The Synthesis Of Monounsaturated Long-Chain Fatty Acids In *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 16, n. 1, p. 104-105, 1979.

DERHAM, B. K.; HARDING, J. J. The Effect Of The Presence Of Globular Proteins And Elongated Polymers On Enzyme Activity. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 1000-1006, 2006.

DESSEN, A.; QUÉMARD, A.; BLANCHARD, J. S.; JACOBS, W. R. Jr.; SACCHETTINI, J. C. Crystal Structure And Function Of The Isoniazid Target Of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 267, n. 5204, p. 1638-1641, 1995.

DIAS, M. V. B.; VASCONCELOS, I. B.; PRADO, A. M. X.; FADEL, V.; BASSO, L. A.; de AZEVEDO, W. F. Jr.; SANTOS, D. S. Crystallographic Studies On The Binding Of Isonicotinyl-NAD Adduct To Wild-Type And Isoniazid Resistant 2-*trans*-enoyl-ACP (CoA) Reductase From *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Struc. Biol.**, v. 159, p. 369-380, 2007.

- DUCATI, R. G.; RUFFINO-NETTO, A.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. The Resumption Of Consumption - A Review On Tuberculosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 7, p. 697-714, 2006.
- ELLIS, R. J. Macromolecular Crowding: Obvious But Underappreciated. **TRENDS Biochem. Sci.** v. 26, n. 10, p. 597-604, 2010.
- ELLIS, R. J. Macromolecular Crowding: An Important But Neglected Aspect Of The Intracellular Environment. **Curr. Opin. in Struc. Biol.** v. 11, p. 114-119, 2001.
- ELLIS, R. J.; MINTON, A. P. Join The Crowd. **Nature**, v. 45, n. 425, p. 27-29, 2003.
- ENGEL, P.C. Enzyme Kinetics, Chapman and Hall: London, 1977, ch. 5, pp. 45-73.
- ESCALANTE, P.; RAMASWAMY, S.; SANABRIA, H.; SOINI, H.; PAN, X.; VALIENTE-CASTILLO, O.; MUSSER, J. M. Genotypic Characterization Of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates From Peru. **Tuber. Lung Dis.** v. 79, n. 2, p. 111-118, 1998.
- FAWCETT, T.; SIMON, W. J.; SWINHOE, R.; SHANKLIN, J.; NISHIDA, I.; CHRISTIE, W. W.; SLABAS, A. R. Expression Of Mrna And Steady-State Levels Of Protein Isoforms Of Enoyl-ACP Reductase From *Brassica napus*. **Plant Mol. Biol.**, v. 26, n. 1, p. 155-163, 1994.
- FERREIRA, L. A.; MADEIRA, P. P.; BREYDO, L.; REICHARDT, C.; UVERSKY, V. N.; ZASLAVSKY, B. Y. Role Of Solvent Properties Of Aqueous Media In Macromolecular Crowding Effects. **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 34, p. 92-103, 2016.
- GRAZIANO, G. How Does Sucrose Stabilize The Native State Of Globular Proteins? **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 50, p. 230-235, 2012.
- GRIMSLEY, G. R.; Pace, C. N. Current Protocols In Protein Science, John Wiley and Sons, Inc: New York, 2003, ch. 3.1, pp. 3.1.1-3.1.9.
- HALL, D.; MINTON, A. P. Macromolecular Crowding: Qualitative And Semiquantitative Successes, Quantitative Challenges. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1649, p. 127-139, 2003.
- HALPERN, A. M. Experimental Physical Chemistry, Prentice Hall, Inc: New Jersey, capítulo 10, p. 493-504, 1997.
- HESS, M.; TIERNEY, J. W. Some Velocity Profile Effects in Empty Tubes, **J. Chromatogr.**, v. 55, p. 165-172, 1971.
- HOBBS, J. K.; JIAO, W.; EASTER, A. D.; PARKER, E. J.; SCHIPPER, L. A.; ARCUS, V. L. Change In Heat Capacity For Enzyme Catalysis Determines Temperature Dependence Of Enzyme Catalyzed Rates. **ACS Chem. Biol.**, v. 8, p. 238-2393, 2013.
- HOMCHAUDHURI, L.; SARMA, N.; SWAMINATHAN, R. Effect Of Crowding By Dextrans And Ficolls On The Rate Of Alkaline Phosphatase-Catalyzed Hydrolysis: A Size-Dependent Investigation. **Biopolymers**, v. 83, p. 477-486, 2006.
- HEYM, B.; COLE, S. T. Isolation And Characterization Of Isoniazid-Resistant Mutants Of *Mycobacterium smegmatis* And *M. aurum*. **Res. Microbiol.**, v. 143, n. 7, p. 721-730, 1992.

- HEYM, B.; ALZARI, P. M.; HONORE, N.; COLE, S. T. Missense Mutations In The Catalase-Peroxidase Gene, *Katg*, Are Associated With Isoniazid Resistance In *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.**, v. 15, n. 2, p. 235-245, 1995.
- HORNAK, V.; ABEL, R.; OKUR, A.; STROCKBINE, B.; ROITBERG, A.; SIMMERLING, C. Comparison Of Multiple Amber Force Fields And Development Of Improved Protein Backbone Parameters. **Proteins**, v. 65, n. 3, p. 712-725, 2006.
- JIANG, M.; GUO, Z. J. Effects Of Macromolecular Crowding On The Intrinsic Catalytic Efficiency And Structure Of Enterobactin-Specific Isochorismate Synthase. **Am. Chem. Soc. Comm.**, v. 129, p. 730-731, 2007.
- JOHNSSON, K.; 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, n. 17, p. 5009-5010, 1995.
- 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, n. 16, p. 7425-7426, 1994.
- KATER, M. M.; KONINGSTEIN, G. M.; NIJKAMP, H. J. J.; STUITJE, A. R. cDNA Cloning And Expression Of *Brassica napus* Enoyl-acyl Carrier Protein Reductase In *Escherichia coli*. **Plant Mol. Biol.**, v. 17, n. 4, p. 895-909, 1991.
- KIRSCHNER, K. N.; YONGYE, A. B.; TSCHAMPEL, S. M.; GONZÁLEZ-OUTEIRIÑO, J.; DANIELS, C. R.; FOLEY, B. L.; WOODS, R. J.; GLYCAM06: A Generalizable Biomolecular Force Field. Carbohydrates. **J. Comput. Chem.**, v. 29, n. 4, p. 622-655, 2008.
- 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.; MUSSER, J. M.; KREISWIRTH, B.; PEROZZO, R.; JACOB Jr, W. J.; SACCHETTINI, J. C.; FIDOCK, D. A. Targeting Tuberculosis And Malaria Through Inhibition Of Enoyl Reductase: Compound Activity And Structural Data. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 23, p. 20851-20859, 2003.
- KUZNETSOVA, I. M.; TUROVEROV, K. K.; UVERSKY, V. N. What Macromolecular Crowding Can Do To A Protein. **Int. J. Mol. Sci.** v. 15, p. 23090-23140, 2014; e referências citadas neste.
- LEE, J. C.; TIMASHEFF, S. N. J. The Stabilization of Proteins by Sucrose. **J. Biol. Chem.** V. 256, p. 7193-7201, 1981.
- LONHIENNE, T.; BAISE E.; FELLER G.; BOURIOTIS V.; GERDAY C. Enzyme Activity Determination On Macromolecular Substrates By Isothermal Titration Calorimetry: Application to Mesophilic and Psychrophilic Chitinases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1545, p. 349-356, 2005.
- LONHIENNE, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Psychrophilic Enzymes: Revisiting The Thermodynamic Parameters Of Activation May Explain Local Flexibility. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1543, p. 1- 10, 2000.
- MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, G.; QUÉMARD, A. Inha, A Target Of The Antituberculosis Drug Isoniazid, Is Involved In A Mycobacterial Fatty Acid Elongation System, FAS-II. **Microbiology**, n. 146, p. 289-296, 2000.

MAXMEN, A. Drug Development: A Combined Effort. **Nature**, v. 502, (7470_supp), S4-S6, 2013.

MDLULI, K.; SHERMAN, D. R.; HICKEY, M. J.; KREISWIRTH, B. N.; MORRIS, S.; STOVER, C. K.; BARRY III, C. E. Biochemical And Genetic Data Suggest That *Inha* Is Not The Primary Target For Activated Isoniazid In *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Infect. Dis.**, v. 174, n. 5, p. 1085-1095, 1996.

MIDDLEBROOK, G. Sterilization Of Tubercle Bacilli By Isonicotinic Acid Hydrazide And The Incidence Of Variants Resistant To The Drug *in vitro*. **Am. Rev. Tuberculosis**, v. 65, n. 6, p. 765-767, 1952.

MINTON, A. P. Excluded Volume As A Determinant Of Macromolecular Structure And Reactivity. **Biopolymers**, v. 20, p. 2093-2120, 1981.

MINTON, A. P. The Effect Of Volume Occupancy Upon The Thermodynamic Activity Of Proteins: Some Biochemical Consequences. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 55, n. 119, p. 119-140, 1983.

MINTON, A. P. Macromolecular Crowding: Analysis Of Effects Of High Concentrations Of Inert Cosolutes On Biochemical Equilibria And Rates In Terms Of Volume Exclusion. **Meth. in Enzymol.**, v. 295, p. 127-149, 1998.

MINTON, A. P. The Influence Of Macromolecular Crowding And Macromolecular Confinement On Biochemical Reactions In Physiological Media. **J. Biol. Chem.** v. 276, 10577-10580, 2001.

MONTEITH, W. B.; COHEN, R. D.; SMITH, A. E.; GUZMAN-CISNEROS, E.; PIELAK, G. J. Quinary Structure Modulates Protein Stability In Cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 112, p. 1739-1742, 2015.

MUSSER, J. M.; KAPUR, V.; WILLIAMS, D. L.; KREISWIRTH, B. N.; SOOLINGEN, D. V.; EMBDEN, J. D. A. V. Characterization Of The Catalase-Peroxidase Gene (*Katg*) And *Inha* Locus In Isoniazid-Resistant And -Susceptible Strains Of *Mycobacterium Tuberculosis* By Automated DNA Sequencing: Restricted Array Of Mutations Associated With Drug Resistance. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 1, p. 196-202, 1996.

O'BRIEN, R.; HAQ, I., Biocalorimetry 2: Applications Of Calorimetry In The Biological Sciences. John Wiley and Sons. In Ladbury JE, Doyle ML, editors, 2004.

OLIVEIRA, J. S.; PEREIRA, J. H.; CANDURI, F.; RODRIGUES, N. C.; DE SOUZA, O. N.; DE AZEVEDO, W. F. JR.; 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, p. 646-666, 2006.

OLSSON, T. S. G.; LADBURY, J. E.; PITT, W. R.; WILLIAMS, M. A. Extent Of Enthalpy-Entropy Compensation In Protein-Ligand Interactions. **Protein Sci.**, v. 20, p. 1607-1618, 2011.

OLSEN, S.N. Applications Of Isothermal Titration Calorimetry To Measure Enzyme Kinetics And Activity In Complex Solutions. **Thermochim. Acta**, v. 448, p. 12-18, 2006.

- PAN, P.; TONGE, P. J. Targeting Inha, The FAS-II Enoyl-ACP Reductase: SAR Studies On Novel Inhibitor Scaffolds. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 12, n. 7, p. 672-693, 2012.
- PARAMO, T.; EAST, A.; GARZÓN, D.; ULMSCHNEIDER, M. B.; BOND, P. J. Efficient Characterization Of Protein Cavities Within Molecular Simulation Trajectories: trj_cavity, **J. Chem. Theory Comput.**, v. 10, n. 5, 2151-2164, 2014.
- PARIKH, S.; MOYNIHAN, D. P.; XIAO, G.; TONGE, P. J. Roles Of Tyrosine 158 And Lysine 165 In The Catalytic Mechanism Of Inha, The Enoyl-ACP Reductase From *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 38, n. 41, p. 13623-13634, 1999.
- PIEHLER, J.; BRENCHT, A.; HEHL, K.; GAUGLITZ, G. Protein Interactions In Covalently Attached Dextran Layers. **Colloid. Surface B**, v. 13, p. 325-336, 1999.
- POZDNYAKOVA, I.; WITTUNG-STAFSHED, P. Non-Linear Effects Of Macromolecular Crowding On Enzymatic Activity Of Multi-Copper Oxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1804, p. 740-744, 2010.
- QUÉMARD, A.; DESSEN, A.; SUGANTINO, M.; JACOBS, W. R. Jr.; SACCHETTINI, J. C.; BLANCHARD, J. S. Binding Of Catalase-Peroxidase-Activated Isoniazid To Wild-Type And Mutant *Mycobacterium Tuberculosis* Enoyl-ACP Reductases. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, n. 6, p. 1561-1562, 1996.
- QUÉMARD, A.; SACCHETTINI, J. C.; DESSEN, A.; VILCHÈZE, C.; BITTMAN, V.; JACOBS, W. R., JR.; BLANCHARD, J. S. Enzymatic Characterization Of The Target For Isoniazid In *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemistry**, v. 34, n. 26, p. 8235-8241, 1995.
- RAFFERTY, J. B.; SIMON, J. W.; BALDOCK, C.; ARTYMIUK, P. J.; BAKER, P. J.; STUITJE, A. R.; SLABAS, A. R.; RICE, D. W. Common Themes In Redox Chemistry Emerge From The X-Ray Structure Of Oilseed Rape (*Brassica Napus*) Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase. **Structure**, v. 3, n. 9, p. 927-938, 1995.
- RALSTON, G. B. Effects of "Crowding" In Proteins Solution. **J. Chem. Edu.** v. 67, 857-860, 2005.
- 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. **P. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 24, p. 13881-13886, 2003.
- ROBERTSON, J. G. Mechanistic Basis Of Enzyme-Targeted Drugs. **Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 5561-5571, 2005.
- ROBERTSON, J. G. Enzymes As A Special Class Of Therapeutic Target: Clinical Drugs And Modes Of Action. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, p. 674-679, 2007.
- ROZWARSKI, D. A.; GRANT, G. A.; BARTON, D. H. R.; JACOBS, W. R. Jr.; SACCHETTINI, J. C. Modification Of The NADH Of The Isoniazid Target (InhA) From *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**, v. 279, p. 98-102, 1998.
- ROZWARSKI, D. A.; VILCHÈZE, C.; SUGANTINO, M.; BITTMAN, R.; SACCHETTINI, J. C. Crystal Structure Of The *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl-ACP Reductase, InhA, In Complex With NAD⁺ And a C16 Fatty Acyl Substrate. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 22, p. 15582-15589, 1999.

- RYCKAER, J. P.; CICCOTTI, G.; BERENDSEN, H. J. C. Numerical Integration Of The Cartesian Equations Of Motion Of A System With Constraints: Molecular Dynamics Of N-Alkanes. **J. Comput. Phys.**, v. 23, p. 327-341, 1977.
- SALOMON-FERRER, R.; GOETZ, A. W.; POOLE, D.; LE GRAND, S.; WALKER, R. C. Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations With AMBER – Part II: Particle Mesh Ewald, **J. Chem. Theory Comput.**, v. 9, n. 9, p. 3878-3888, 2013.
- SAPIR, L.; HARRIES, D. Is the Depletion Force Entropic? Molecular Crowding Beyond Steric Interactions. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 20, p. 3-10, 2015.
- SCHROEDER, E. K.; de SOUZA, O. N.; SANTOS, D. S.; BLANCHARD, J. S.; BASSO, L. A. Drugs That Inhibit Mycolic Acid Biosynthesis In *Mycobacterium tuberculosis*. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 3, n. 3, p. 197-225, 2002.
- SCHROEDER, E. K.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S.; DE SOUZA, O. N. Molecular Dynamics Simulation Studies Of The Wild-Type, I21V, And I16T Mutants Of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase (Inha) In Complex With NADH: Toward The Understanding Of NADH-Inha Different Affinities. **Biophysical Journal**, v. 89, p. 876-884. 2005.
- SCHRÖDINGER, L. L. C. The {PyMOL} Molecular Graphics System, Version~1.3r1; 2010.
- SEGEL, I. H. Enzyme Kinetics, Behavior And Analysis Of Rapid Equilibrium And Steady-State Enzyme Systems, John Wiley and Sons, Inc: New York, 1975, ch. 2, pp. 18-50 , ch. 11, pp. 931-942.
- SENSKE, M.; TÖRK, L.; BORN, B.; HAVENITH, M.; HERRMANN, C.; EBBINGHAUS, S. Protein Stabilization By Macromolecular Crowding Through Enthalpy Rather Than Entropy. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 136, p. 9036-9041, 2014.
- SHKEL, A. I.; KNOWLES, D. B.; RECORD Jr, T. Separating Chemical And Excluded Volume Interactions Of Polyethylene Glycols With Native Proteins: Comparison With PEG Effects On DNA Helix Formation. **Biopolymers**, v. 103, p. 517-527, 2015.
- de SOUZA, O. N.; ORNSTEIN, R. L. Molecular Dynamics Simulations Of A Protein-Protein Dimmer: Particle-Mesh Ewald Electrostatic Model Yields Far Superior Results To Standard Cutoff Model, **J. Biomol. Struct. Dyn.**, v. 16, p. 1025-1218, 1999.
- SUTHAR, M. K.; DOHAREY, P. K.; VERMA, A.; SAXENA, J. K. Behavior Of *Plasmodium falciparum* Purine Nucleoside Phosphorylase In Macromolecular Crowded Environment. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 62, p. 657-662, 2013.
- SWEET, W. L.; BLANCHARD, J. S. Fumarase: Viscosity Dependence Of The Kinetic Parameters. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 277, n.1, p. 196-202, 1990.
- TAKAYAMA, K.; SCHNOES, H. K.; ARMSTRONG, E. L.; BOYLE, R. W. Site Of Inhibitory Action Of Isoniazid In The Synthesis Of Mycolic Acids In *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Lipid. Res.**, v. 16, n. 4, p. 308-317, 1975.
- TAKAYAMA, K.; WANG, L.; DAVID, H. L. Effect of Isoniazid On The *In vivo* Mycolic Acid Synthesis, Cell Growth, And Viability of *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 2, n. 6, p. 29-35, 1972.

TAKAYAMA, K.; WANG, C.; BESRA, G. S. Pathway To Synthesis And Processing Of Mycolic Acids In *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, n. 1, p. 81-100, 2005.

TOTANI, K.; IHARA, Y.; MATSUO, I.; ITO, Y. Effects Of Macromolecular Crowding On Glycoprotein Processing Enzymes. **J. Am. Chem. Soc.** v. 130, p. 2101–2107, 2008.

TUBERCULIST. Disponível em: <http://tuberculist.epfl.ch/>. Acesso em: 29 de dezembro de 2016. Banco de dados referencial.

VASCONCELOS, I. B.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Kinetic And Equilibrium Mechanisms Of Substrate Binding To *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Reductase: Implications To Function-Based Antitubercular Agent Design. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 8, p. 1503-1508, 2010.

VASILEF, I. QtiPlot: Data Analysis And Scientific Visualization, 2009.

VILCHÈZE, C.; MORBIDONI, H. R.; WEISBROD, T. R.; IWAMOTO, H.; KUO, M.; SACCHETTINI, J. C.; JACOBS, W. R. Jr. Inactivation Of The *inhA*-encoded Fatty Acid Synthase II (FASII) Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Induces Accumulation Of The FASI End Products And Cell Lysis Of *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 14, p. 4059-4067, 2000.

WANDREY, C.; BARTKWIAK, A.; HUNKELER, D. Partial Molar And Specific Volumes Of Polyelectrolytes: Comparison Of Experimental And Predicted Values In Salt-Free Solutions. **Langmuir**, v. 15, n. 12, p. 4062-4068, 1999.

WHEELER P. R.; ANDERSON, P. M. Determination Of The Primary Target For Isoniazid In Mycobacterial Mycolic Acid Biosynthesis With *Mycobacterium aurum* A+. **Biochem. J.**, v. 318, n. 2, p. 451-457, 1996.

WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition By Isoniazid Of Synthesis Of Mycolic Acids In *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 63, p. 41-48, 1970.

WHO, Global tuberculosis control: WHO report 2015.

WOOD, W. I.; PETERSON, D. O.; BLOCH, K. *Mycobacterium smegmatis* fatty Acid Synthetase: A Mechanism Based On Steady-State Rates And Product Distributions. **J. Biol. Chem.** v. 252, n. 16, p. 5745-5749, 1977.

ZIMMERMAN, S. B.; MINTON, A. P. Macromolecular Crowding: Biochemical, Biophysical, And Physiological Consequences. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 22, 27-65, 1993.

ZIMMERMAN, S. B. Macromolecular Crowding Effects On Macromolecular Interactions: Some Implications For Genome Structure And Function. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1216, 175-185, 1993.

ZHOU, H-X.; RIVAS, G.; MINTON, A. P. Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, And Potential Physiological Consequences. **Annu. Rev. Biophys.** v. 37, 375-397, 2008.

Anexos



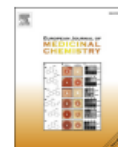
Anexo- A

European Journal of Medicinal Chemistry 90 (2015) 436–447



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

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

Original article

Piperazine derivatives: Synthesis, inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase and SAR studies



Mariane Rotta ^{a, b}, Kenia Pissinate ^{a, b}, Anne Drumond Villela ^{a, c}, Davi Fernando Back ^d, Luis Fernando Saraiva Macedo Timmers ^{a, b, e}, José Fernando Ruggiero Bachega ^{a, e}, Osmar Norberto de Souza ^{a, b, e}, Diógenes Santiago Santos ^{a, b, *}, Luiz Augusto Basso ^{a, b, c}, Pablo Machado ^{a, b, *}

^a Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Departamento de Química, Laboratório de Materiais Inorgânicos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

^e Laboratório de Bioinformática, Modelagem e Simulação de Biosistemas – LABIO, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2014

Received in revised form

13 November 2014

Accepted 18 November 2014

Available online 18 November 2014

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis

Tuberculosis

Enoyl-ACP reductase

InhA inhibition

Piperazines

ABSTRACT

The *Mycobacterium tuberculosis* NADH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase (*MtInhA*) catalyzes hydride transfer to long-chain enoyl thioester substrates. *MtInhA* is a member of the mycobacterial type II dissociated fatty acid biosynthesis system, and is the bona fide target for isoniazid, the most prescribed drug for tuberculosis treatment. Here, a series of piperazine derivatives was synthesized and screened as *MtInhA* inhibitors, which resulted in the identification of compounds with IC₅₀ values in the submicromolar range. A structure–activity relationship (SAR) evaluation indicated the importance of the chemical environment surrounding the carbonyl group for inhibition. In addition, the structure of one selected compound was supported by crystallographic studies, and experimental geometrical values were compared with semi-empirical quantum chemical calculations. Furthermore, the mode of inhibition and inhibitory dissociation constants were determined for the nine most active compounds. These findings suggest that these 9H-fluoren-9-yl-piperazine-containing compounds interact with *MtInhA* at the enoyl thioester (2-*trans*-dodecenoyl-CoA) substrate binding site.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Anexo - B

Pharmacology, Biochemistry and Behavior 129 (2015) 72–78



Contents lists available at ScienceDirect

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

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

Structural improvement of compounds with analgesic activity: AC-MPF4, a compound with mixed anti-inflammatory and antinociceptive activity via opioid receptor



Mateus Fortes Rossato ^{a,*}, Sara Marchesan Oliveira ^a, Gabriela Trevisan ^a, Mariane Rotta ^b, Pablo Machado ^b, Marcos A.P. Martins ^b, Juliano Ferreira ^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica Toxicológica, Laboratório de Psicofarmacologia e Neurotoxicidade, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

^b Núcleo de Química de Heterociclos (NUQUIMHE), Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 April 2014

Received in revised form 29 November 2014

Accepted 6 December 2014

Available online 13 December 2014

Keywords:

Antinociception
Anti-inflammatory
Carrageenan
NSAID
Pyrazole
Opioid

ABSTRACT

Successful pain control is a world health problem, which indicates an ever-growing need in the discovery of new molecules with improved analgesic activity and reduced side effects. The aim of this study was to describe the synthesis and biological activity of AC-MPF4, a new acetyl- and pyrazole-containing molecule derivative from MPF4. Firstly, we evaluated the analgesic and anti-edematogenic effect of AC-MPF4 in the carrageenan test. AC-MPF4 presented similar analgesic properties to MPF4 (opioid drug) and acetylsalicylic acid (ASA—a non-steroidal anti-inflammatory drug) (maximal effect of $85.4 \pm 10.9\%$, $62.0 \pm 11.0\%$ and $95.0 \pm 10.4\%$ of allodynia reduction, respectively). Regarding anti-edematogenic properties, AC-MPF4 presented similar results to ASA, while MPF4 presented no effect (maximal effect of $42.2 \pm 8.3\%$ and $46.1 \pm 5.1\%$ in paw thickness reduction, respectively). Remarkably, Naloxone fully prevented the analgesic effect of MPF4 and partially prevented the analgesic effect of AC-MPF4. However, neither ASA nor the anti-edematogenic activity was affected by Naloxone. The gastrointestinal motility and gastric mucosa integrity, which are parameters affected by opioid and NSAID drugs, respectively, were also evaluated. Neither of these parameters showed alterations induced by AC-MPF4, whereas ASA induced gastric ulceration (10 fold higher), and MPF4 decreased gastrointestinal motility ($62.0 \pm 7.7\%$). Together, these data indicate that AC-MPF4 presents good analgesic and anti-edematogenic effects with no detectable side effects. AC-MPF4 may be considered a good prototype for the development of new analgesic/anti-inflammatory drugs.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Anexo -C

RSC Advances



PAPER

View Article Online
View Journal | View IssueCite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 74671

Mode of action of recombinant hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis*

Paulo C. Patta,^{†ab} Leonardo K. B. Martinelli,^{†a} Mariane Rotta,^{†ac} Bruno L. Abbadi,^{†ab} Diogenes S. Santos^{†*ab} and Luiz A. Basso^{†*ab}

Tuberculosis (TB) is the second most important cause of mortality worldwide due to a single infectious agent, *Mycobacterium tuberculosis*. A better understanding of the purine salvage pathway can unveil details of the biology of *M. tuberculosis* that might be used to develop new strategies to combat this pathogen. Hypoxanthine–guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) is an enzyme from the purine phosphoribosyltransferase (PRTase) family and catalyzes the conversion of hypoxanthine or guanine and 5-phospho- α -D-ribose 1-diphosphate (PRPP) to, respectively, inosine 5'-monophosphate (IMP) or guanosine 5'-monophosphate (GMP), and pyrophosphate (PPi). Gel filtration chromatography has shown that recombinant *M. tuberculosis* HGPRT (MthGPRT) is homodimeric. A sequential compulsory ordered enzyme mechanism with PRPP as the substrate that binds to free MthGPRT enzyme and PPi as the first product to dissociate is proposed based on kinetic data and thermodynamics of ligand binding from isothermal titration calorimetry (ITC) results. ITC data have also provided thermodynamic signatures of non-covalent interactions for PRPP, IMP and GMP binding to free MthGPRT. Thermodynamic activation parameters (E_a , ΔG^\ddagger , ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger) for the MthGPRT-catalyzed chemical reaction, pre-steady-state kinetics, solvent kinetic isotope effects, equilibrium constants and pH-rate profiles are also presented. Pre-steady-state analysis reveals that there is an initial rapid phase (burst) followed by a slower phase, suggesting that product release is rate limiting. The data here described provide a better understanding of the mode of action of MthGPRT.

Received 27th July 2015
Accepted 28th August 2015

DOI: 10.1039/c5ra14918e

www.rsc.org/advances

Anexo D

**Current Topics in
Pharmacology**

Vol. 19, 2015

Original Communication

Voltammetric detection and quantification of pentacyano(isoniazid)ferrate(II), a metal-based drug candidate for the treatment of tuberculosis

Adilio da S. Dadda^{a,b}, Valnês S. Rodrigues-Junior^{a,b}, Mariane Rotta^{a,c}, Leonardo K. B. Martinelli^{a,b}, Maria M. Campos^{a,c,d}, Eduardo H. S. Sousa^c, Antônio F. M. Pinto^a, Pablo Machado^{a,b}, Luiz A. Basso^{a,b,c,*,#} and Diógenes S. Santos^{a,b,*S}

^aCentro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose (INCT-TB), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), 6681/92A Av. Ipiranga, 90619-900; ^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 6681/12A Av. Ipiranga, 90619-900; ^cPrograma de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, 6690/60 Av. Ipiranga, 90610-000; ^dInstituto de Toxicologia e Farmacologia, 6681/12C Av. Ipiranga, 90619-900, Porto Alegre, RS, PUCRS; ^eDepartamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Cx. Postal 6021, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil.

Anexo E

23-Sep-2016

Dear Dr. Machado:

Your manuscript entitled "Synthesis, inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase and antimycobacterial activity of novel pentacyanoferrate(II)-isonicotinoylhydrazones" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Journal of the Brazilian Chemical Society.

Your manuscript ID is JBCHS-2016-0672.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/jbchs-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of the Brazilian Chemical Society.

Sincerely,
Journal of the Brazilian Chemical Society Editorial Office

Synthesis, inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-acyl carrier protein reductase and antimycobacterial activity of novel pentacyanoferrate(II)-isonicotinoylhydrazones

Thais Pletch Gazzi ^{1#}, Mariane Rotta ^{1,3#}, Anne Drumond Villela ^{1,3}, Valnês Rodrigues-Junior ^{1,2}, Leonardo Kras Borges Martinelli ^{1,2}, Francisco Adilson Matos Sales ⁴, Eduardo Henrique Silva de Sousa ⁴, Maria Martha Campos ¹⁻³, Luiz Augusto Basso ¹⁻³, Diógenes Santiago Santos ^{1,2*}, Pablo Machado ^{1,2*}

¹Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Tuberculose, Centro de Pesquisas em Biologia Molecular e Funcional, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil

²Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 90619-900, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, 60440-900, Fortaleza, Ceará, Brazil

*Corresponding authors. Phone/Fax: +55 51 3320 3629

E-mail addresses: diogenes@pucrs.br (D.S. Santos); pablo.machado@pucrs.br (P. Machado)

#These authors contributed equally to this work.

Anexo F

Comprovante de submissão

10-Nov-2016

RE: Manuscript Successfully Submitted

Journal: Journal of the American Chemical Society

Manuscript ID: ja-2016-11664q

Manuscript Type: Article

Manuscript Title: Effects of macromolecular crowding on enzyme kinetics of 2-trans-enoyl-ACP (CoA) reductase from Mycobacterium tuberculosis

Author(s): Rotta, Mariane, Timmers, Luis, Sequeiros-Borjal, Carlos, Norberto de Souza, Osmar, Santos, Diogenes, Basso, Luiz

Dear Dr. Basso:

Your manuscript has been successfully submitted to the Journal of the American Chemical Society. Submission of a manuscript to JACS is contingent upon the agreement by all the authors that the reported work has not received prior publication and that no portion of this or any other closely related work is under consideration for publication elsewhere in any medium, including electronic journals, computer databases, and publicly accessible preprint Web sites. This manuscript is being considered for possible JACS publication with the understanding that it is submitted on an exclusive basis. If otherwise, please advise us immediately.

Please refer to the above manuscript ID in all email correspondence or when calling the JACS Editorial office with questions. If there are any changes in your contact information, please login to ACS Paragon Plus at <https://acs.manuscriptcentral.com/acs> and select "Edit Your Account" to update that information.

You can view the status of your manuscript by checking your "Authoring Activity" tab on ACS Paragon Plus after logging in to <https://acs.manuscriptcentral.com/acs>.

Thank you for submitting your manuscript to the Journal of the American Chemical Society.

Sincerely,

Peter J. Stang

Editor

Journal of the American Chemical Society

Phone: [801-585-6415](tel:801-585-6415)

Fax: [202-354-4650](tel:202-354-4650)

Email: jacs@jacs.acs.org