

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JOÃO PEDRO SALAZAR MARTINS

Estudos de biologia estrutural e química medicinal para descoberta de inibidores
da enzima piruvato quinase II de *Plasmodium falciparum*

São Carlos
2024

JOÃO PEDRO SALAZAR MARTINS

Estudos de biologia estrutural e química medicinal para descoberta de inibidores da enzima piruvato quinase II de *Plasmodium falciparum*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Bacharel em Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Victório Carvalho Guido - IFSC

São Carlos
2024

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

Martins, João Pedro Salazar

Estudos de biologia estrutural e química medicinal para descoberta de inibidores da enzima piruvato quinase II de *Plasmodium falciparum* / João Pedro Salazar Martins; orientador Rafael Victório Carvalho Guido – São Carlos, 2024. 26 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Físicas e Biomoleculares) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Malária. 2. Enzimologia. 3. *Plasmodium falciparum*. I. Título. II. Guido, Rafael Victório Carvalho, orient.

RESUMO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium*. Apesar dos esforços na busca de tratamentos, a doença permanece como um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Nesse âmbito, as enzimas da via glicolítica têm sido exploradas como alvos moleculares para inibir o desenvolvimento do parasito e combater a doença. A enzima piruvato quinase II de *Plasmodium falciparum* (PfPKII) catalisa a última reação da glicólise e está localizada em uma organela exclusiva desse protozoário cuja atividade é essencial para o metabolismo do parasito. Portanto, este estudo visa a descoberta de inibidores da PfPKII através da triagem de compostos e ensaios cinéticos frente à enzima, determinando parâmetros como potência, afinidade e mecanismo de inibição. Inicialmente, a expressão heteróloga e purificação da PfPKII conduziram a uma proteína de pureza adequada com valores de K_M^{App} para os substratos da enzima, PEP e ADP, de $(25,4 \pm 0,5) \mu M$ e $(50 \pm 6) \mu M$, respectivamente. Foram testadas bibliotecas de compostos totalizando 640 moléculas contra a PfPKII para avaliação quanto à potência inibitória, cujo resultado levou a identificação de dois compostos com inibição superior a 50 % @ 40 μM , MMV020520 e MMV228911. A partir desse resultado, foram adquiridos os compostos pelo consórcio do MMV para reproduzir os testes cinéticos, mas a reprodutibilidade da inibição não foi observada. Provavelmente, isso se deve a degradação dos compostos nas placas inicialmente disponibilizadas. Através da revisão da literatura, encontrou-se o ácido tânico (AT), um polifenol de origem natural que apresenta atividade inibitória contra a piruvato quinase isoenzima M2 humana (PKM2). O AT foi adquirido e testado contra a PfPKII, apresentando potente inibição com $IC_{50}^{PfPKII} = (1,4 \pm 0,5) \mu M$. Estudos de cinética inibitória revelaram que o AT possui um comportamento não-competitivo frente ao PEP e ADP. Um ensaio de suplementação com frutose-1,6-bifosfato (FBP) revelou que o mecanismo de inibição do AT na PfPKII é diferente do já reportado na literatura para a PKM2, portanto são necessárias novas análises para determinação do mecanismo de ação do AT na PfPKII. Esses resultados indicam que a PfPKII é um alvo passivo de inibição e atrativo para a descoberta de novos inibidores como candidatos a fármacos para a malária. Para trabalhos futuros, planeja-se determinar a estrutural tridimensional da PfPKII, abrindo novos caminhos promissores no planejamento de inibidores da enzima.

Palavras-chave: Enzimologia, Malária, *Plasmodium falciparum*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1	Expressão e purificação da piruvato quinase II recombinante de <i>P. falciparum</i>	9
2.2	Ensaio acoplado de atividade enzimática da piruvato quinase II de <i>P. falciparum</i> ..	10
2.3	Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{App}) da <i>PfPKII</i>	11
2.4	Ensaio de inibição da piruvato quinase II de <i>P. falciparum</i>	12
3	RESULTADOS	13
3.1	Expressão e purificação da enzima piruvato quinase II de <i>P. falciparum</i>	13
3.2	Caracterização dos parâmetros cinéticos da piruvato quinase II de <i>P. falciparum</i> ..	14
3.3	Triagem de compostos candidatos a inibidores da <i>PfPKII</i> com possível atividade antiplasmodial.....	16
3.4	Ácido tânico como um potente inibidor da <i>PfPKII</i> com possível atividade antiplasmodial.....	18
3.5	Determinação do mecanismo de inibição do ácido tânico frente a <i>PfPKII</i>	19
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoário do gênero *Plasmodium spp*, sendo o *Plasmodium falciparum* responsável pela forma mais letal da doença. A patologia é transmitida aos humanos através da picada de fêmeas do mosquito *Anopheles spp* e, apesar dos esforços no combate à doença, em 2022 foram reportados 249 milhões de novos casos e 608 mil mortes causadas pela doença. (1)

A linha de frente no tratamento da malária se dá pela terapia combinada com derivados de artemisinina (ACT, do inglês *artemisinin combination therapy*). (2) No entanto, estudos recentes revelaram um surgimento de resistência parcial de parasitos à artemisinina e seus derivados. (3) Nesse âmbito, surge a necessidade pela busca de novos candidatos a fármacos antimaláricos e terapias inovadoras que minimizem o impacto da resistência adquirida, trazendo outros medicamentos com mecanismos de ação distintos dos já existentes.

Enzimas glicolíticas são alvos terapêuticos importantes e validados nas buscas em larga escala por candidatos antimaláricos devido à sua importância para a produção de energia e outras funções fisiológicas no parasito. (4-8) Entre as diversas enzimas da via glicolítica, destaca-se a piruvato quinase (EC 2.7.1.40), presente na etapa final da glicólise e responsável por catalisar a conversão irreversível de fosfoenolpiruvato (PEP) e adenosina difosfato (ADP) em piruvato e adenosina trifosfato (ATP) através de uma reação de fosforilação.

Duas isoformas da piruvato quinase (tipo I e tipo II) são reportadas no parasito. A *PfPKI* está localizada no citoplasma e demonstra propriedades glicolíticas convencionais, enquanto a *PfPKII* está presente no apicoplasto, onde desempenha uma função importante na biossíntese de ácidos graxos do tipo II. (9) Estudos recentes demonstraram que a *PfPKII* é essencial na manutenção da atividade metabólica do apicoplasto através da geração de nucleotídeos trifosfatados como fonte de energia para a organela. (10) O apicoplasto, uma organela exclusiva de protozoários do filo Apicomplexa, é indispensável para o parasito. A função essencial da *PfPKII* nesta organela torna a enzima um alvo molecular interessante na busca por inibidores candidatos a compostos líderes para a malária. Além disso, a ausência de inibidores e estrutura tridimensional reportados para a enzima fortalece o pioneirismo do seu estudo.

Nesse contexto, métodos de biologia estrutural associados à química medicinal são importantes ferramentas para a descoberta de fármacos, direcionando a triagem de compostos e viabilizando a identificação de *hits*, moléculas com atividade biológica contra a doença alvo, até a otimização para se tornarem compostos líderes. Dentre as estratégias de planejamento de fármacos,

destacam-se as estratégias de planejamento de fármacos baseadas na estrutura do receptor (SBDD, do inglês *structure-based drug design*) ou na estrutura do ligante (LBDD, do inglês *ligand-based drug design*). (11)

Os métodos SBDD são empregados quando há conhecimento da estrutura tridimensional dos alvos biológicos, como proteínas e organelas, obtida a partir de técnicas experimentais (cristalografia de raios-X, ressonância magnética nuclear e crio-microscopia eletrônica) ou *in silico* (modelagem *Ab initio*, modelagem por homologia ou modelagem por *AlphaFold*). Por outra perspectiva, os métodos LBDD utilizam a modelagem e análises de ligantes conhecidos, cujo perfil biológico e estrutural pode ser obtido através de bancos de dados públicos e particulares, como síntese de novas moléculas. As principais técnicas envolvem o estudo da correlação entre a estrutura do ligante e a atividade biológica (SAR, do inglês *structure-activity relationship*), otimizando as propriedades farmacológicas das moléculas. (12)

Posteriormente, é crucial realizar ensaios biológicos frente ao alvo, buscando validar ou descobrir a interação de um possível inibidor. Nessa perspectiva, a clonagem molecular é uma técnica imprescindível que viabiliza a expressão de genes de outros organismos em vetores controlados. A técnica envolve uma série de etapas que envolvem isolar o DNA do organismo, selecionar e clonar o gene de interesse, transferir o gene para uma célula hospedeira, expressar e purificar a proteína final. (13) A proteína recombinante pode então ser utilizada para análises de função biológica, características físico-químicas e elucidação estrutural através das técnicas já mencionadas. No contexto enzimático, ensaios de cinética são importantes aliados para estudar as propriedades de interação de um inibidor, revelando parâmetros como potência, seletividade e mecanismo de inibição.

Logo, devido à necessidade de encontrar novos candidatos a inibidores dos parasitos resistentes aos principais fármacos antimaláricos disponíveis, esse projeto de pesquisa teve como objetivo a descoberta de inibidores da enzima *PfPKII* de *P. falciparum* como candidatos a *hits* através da prospecção de coleções de compostos selecionados. Foram empregadas técnicas de clonagem molecular para obtenção da *PfPKII* recombinante, aliadas à química medicinal no contexto da realização de ensaios de cinética enzimática para descoberta de inibidores da *PfPKII*. Nesse sentido, a triagem biológica frente à *PfPKII* é inovadora e pode ser utilizada para indícios do modo de ação no caso de ensaios fenotípicos contra o parasito.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Expressão e purificação da piruvato quinase II recombinante de *P. falciparum*

O vetor pMAL-cHT (Figura 1) contendo a clonagem da sequência codificante (resíduos 42–745) para a piruvato quinase II de *P. falciparum* (PfPKII) foi doado pelo professor Dr. Sean Prigge da Universidade *Johns Hopkins*. Brevemente, a expressão da PfPKII se deu através da cepa de expressão *E. coli* BL21 Rosetta (DE3), em meio Luria-Bertani (LB) com adição do plasmídeo suplementar pRIL. As colônias de *E. coli* BL21 transformadas contendo os plasmídeos pMAL-cHT-PfPKII (ampicilina resistente) e o plasmídeo auxiliar pRIL (cloranfenicol resistente) foram selecionadas e cultivadas aerobiamente a 37 °C em meio LB a 220 rpm. Após atingir uma densidade óptica em 600 nm (D.O._{600 nm}) de 0,6, foi adicionado 0,4 mM de IPTG para indução da expressão e incubado no shaker por 16 horas a 18 °C e 220 rpm. As células foram centrifugadas e o pellet foi congelado e armazenado a -20 °C.

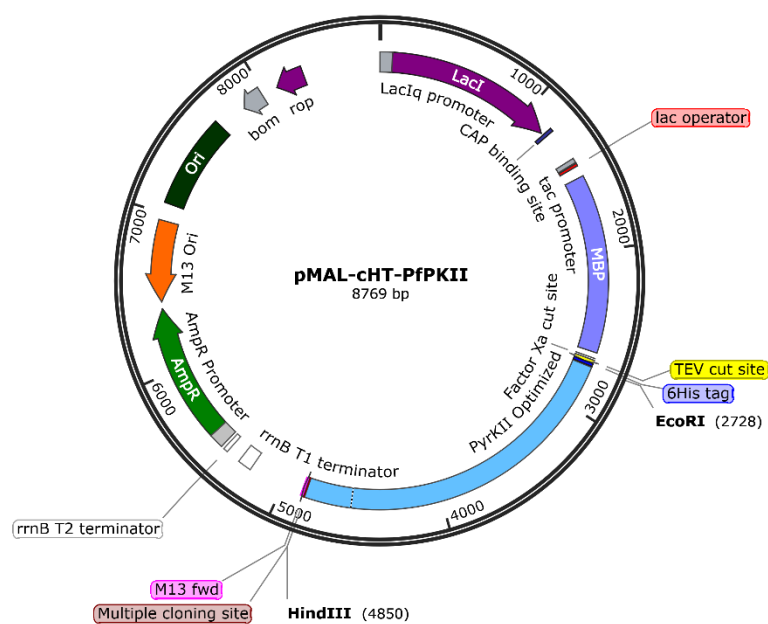


Figura 1 - Mapa do vetor pMAL-cHT-PfPKII utilizado para expressão da proteína recombinante. O sítio de TEV está representado em amarelo, na interface entre a proteína de ligação à maltose (MBP, lilás) e a cHT-PfPKII (azul claro).

Fonte: Elaborada pelo autor

Para realizar a lise das células e liberar as proteínas citosólicas, o pellet de células foi descongelado e ressuspensionado em tampão de lise (20 mM Tris pH 7,5, 100 mM KCl, 0,2 U/mL benzonase, 1,4 mg/mL lisozima, 0,4 mM PMSF) e lisado por sonicação (amplitude: 25 %; pulso

ligado: 25 segundos; pulso desligado: 30 segundos). O lisado obtido foi centrifugado e as frações solúvel e insolúvel foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12.5%) para avaliação dos níveis de expressão da *PfPKII*. As etapas de purificação da *PfPKII* envolvem técnicas cromatográficas baseadas na construção do vetor, como: i. isolar a MBP-cHis-*PfPKII* do clarificado pela afinidade com a resina de afinidade com a cauda de MBP (Cromatografia de afinidade em MBP Trap 1 mL (Cytiva)); ii. clivar a proteína quimérica com a protease TEV, liberando a *tag* de MBP; iii. isolar a cHis-*PfPKII* e TEV das remanescentes MBP através de uma segunda cromatografia de afinidade com resina carregada com Ni^{2+} (Cromatografia de afinidade em HisTrap HP 5 mL (Cytiva)); iv. Isolar a cHis-*PfPKII* sob o estado de tetrâmero dos estados remanescentes através do método de gel filtração (Cromatografia de exclusão molecular 16/600 Superdex 200 pg (Cytiva)). O grau de pureza da *PfPKII* foi determinado através de análise de eletroforese em gel de poliacrilamida SDS PAGE 12,5% e a concentração da proteína foi analisada pelo nanodrop.

2.2 Ensaios acoplado de atividade enzimática da piruvato quinase II de *P. falciparum*

A atividade da piruvato quinase II é medida a partir de um ensaio acoplado, padronizado anteriormente em nosso laboratório (14) e baseado no trabalho de Mohammadi e colaboradores. (15) O ensaio acoplado foi composto por duas reações: i. a primeira reação consiste na reação de catálise da *PfPKII*, que converte PEP em piruvato e ATP em ADP; ii. A segunda reação é realizada pela enzima luciferase, presente no kit *Kinase-Glo Plus* (Promega), que converte luciferina em oxiluciferina e ATP em AMP. A reação utiliza uma luciferase modificada com a capacidade de liberar energia na forma de luminescência, cujo valor é diretamente proporcional à quantidade de ATP convertido em AMP (Figura 1) e pode ser medido utilizando um luminômetro no espectro do verde (550 nm).

A mistura reacional do ensaio acoplado foi composta de tampão MOPS 100 mM pH 7,3, 1,5 mM MgCl_2 , 1 mM β -mercaptoetanol, 0,001 % Triton X-100, 50 nM de *PfPKII* e concentrações dos substratos PEP e ADP a serem determinadas, com volume final de 50 μL . A reação foi conduzida em placas brancas de 96 poços. A mistura sem adição de PEP foi incubada a 37 °C por 20 minutos e, após, foi adicionado o PEP e incubou-se a reação por mais 20 minutos na presença dos substratos a 37 °C. Um volume de 50 μL do reagente *Kinase-Glo Plus* foi adicionado e após 5 minutos de incubação realizou-se a leitura da luminescência a 550 nm através do luminômetro *GloMax Navigator Microplate Luminometer* (Promega). A atividade da enzima foi medida com base na normalização

dos valores de luminescência (RLU, do inglês *relative luminescence units*) em relação a um controle negativo de atividade (sem adição de substrato).

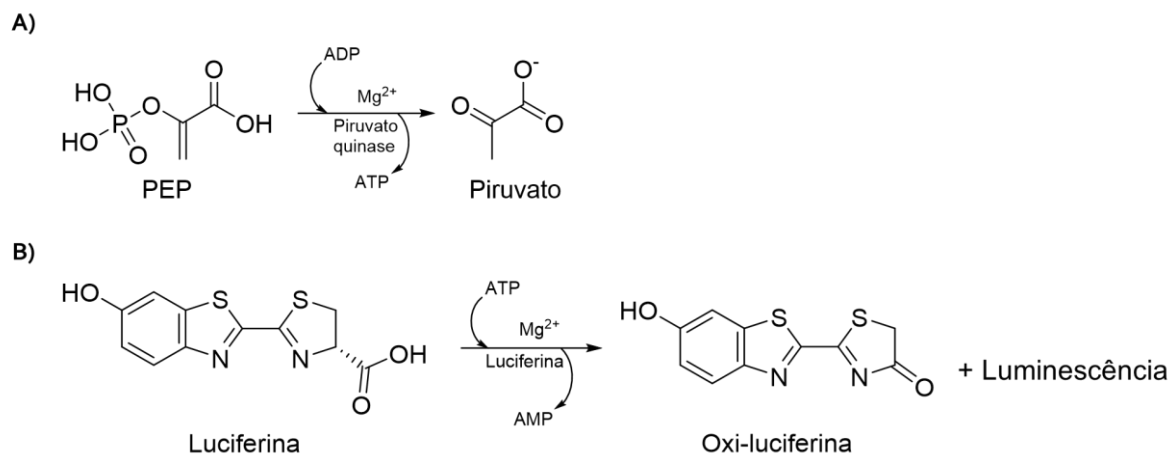


Figura 2 - Esquema reacional do ensaio acoplado utilizado na identificação da atividade enzimática da *Pf*PKII. (A) reação de catálise da *Pf*PKII e (B) reação de catálise da luciferase, cuja luminescência resultante pode ser utilizada como parâmetro para atividade da *Pf*PKII.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.3 Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{App}) da *Pf*PKII

Para determinar as concentrações de substrato a serem utilizadas nos ensaios posteriores, é necessário determinar alguns parâmetros cinéticos da *Pf*PKII. Para isso, utilizou-se da cinética de Michaelis-Menten de forma adaptada, seguindo a equação:

$$RLU = \frac{RLU_{m\acute{a}x} [S]}{K_M^{App} + [S]} \quad (1)$$

onde, RLU é a unidade relativa de luminescência da reação, [S] é a concentração de substrato, $RLU_{m\acute{a}x}$ é a luminescência relativa máxima da reação e K_M^{App} é a constante de Michaelis-Menten aparente, que indica a concentração de substrato a metade da luminescência relativa máxima da reação ($0,5 \cdot RLU_{m\acute{a}x}$). O termo constante de Michaelis-Menten aparente (K_M^{App}) se dá ao fato de que o ensaio acoplado descrito em 2.2 dá um parâmetro de atividade diferente da velocidade da reação, portanto a cinética descrita é uma aproximação baseada nas equações deduzidas por Leonor Michaelis e Maud Menten. (16)

Nesse contexto, a determinação do K_M^{App} foi realizada utilizando a metodologia descrita em 2.2, em que a luminescência será analisada a partir da variação das concentrações de substrato da

enzima. O K_M^{App} do PEP foi medido em uma concentração fixa de 40 μ M de ADP e concentrações variando de 0 – 1 mM de PEP. Já o K_M^{App} do ADP foi medido em uma concentração fixa de 40 μ M de PEP e variação de 0 – 0,25 mM de ADP. Os dados de luminescência foram analisados a partir de regressão não linear, com auxílio do software *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software Inc.)

2.4 Ensaio de inibição da piruvato quinase II de *P. falciparum*

O ensaio de inibição da atividade enzimática da *Pf*PKII foi realizado em presença do candidato a inibidor. O composto foi adicionado à mistura reacional sem PEP e incubado por 20 minutos a 37 °C. Após, o ensaio seguiu conforme descrito em 2.2. A triagem bioquímica para identificação de moléculas capazes de inibir a atividade da *Pf*PKII foi conduzida através de comparação da atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor. Utilizou-se um controle positivo (CP) e um controle negativo (CN). O controle positivo é composto pela mistura reacional já mencionada e pelo PEP, enquanto o controle negativo é composto apenas pela mistura, fornecendo o percentual de inibição que foi calculado utilizando a equação:

$$\% \text{ Inibição} = 100 * \left(1 - \left(\frac{S_A - CN}{CP - CN} \right) \right) \quad (2)$$

onde S_A é a luminescência da amostra testada medida a 550 nm, CN é o controle negativo e CP é o controle positivo. Levando em consideração a padronização realizada para o ensaio, o teste de potenciais inibidores foi conduzido na concentração de 40 μ M do candidato a inibidor. Uma vez que não existem inibidores conhecidos da *Pf*PKII, definimos um mínimo de 50% de inibição para que os compostos sejam utilizados na etapa seguinte de determinação da concentração inibitória (IC_{50}), para determinação da potência do inibidor. O mecanismo de inibição e constantes de inibição foram determinadas através da análise por regressão não linear, com o auxílio do software *GraphPad Prism 8*.

3 RESULTADOS

3.1 Expressão e purificação da enzima piruvato quinase II de *P. falciparum*

A expressão da *Pf*PKII foi realizada conforme descrito no tópico 2.1 da metodologia. A Figura 3 apresenta o gel de eletroforese SDS-PAGE 12,5% utilizado para acompanhar e identificar o grau de pureza da enzima durante as etapas de purificação. A Figura 4 indica os cromatogramas obtidos durante o processo de purificação nas colunas de MBP Trap, His Trap e Gel filtração.

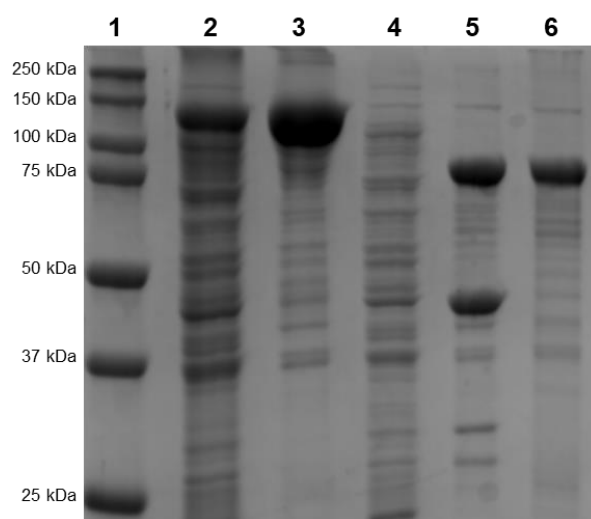


Figura 3 - Gel de eletroforese de SDS-PAGE de 12,5 % do processo de purificação da *Pf*PKII. Os números representam o processo progressivo de purificação de forma a se ter: 1) marcador de tamanho molecular; 2) fração solúvel; 3) eluição com 100 mM de maltose (MBP Trap); 4) eluição sem maltose na coluna de afinidade MBP Trap; 5) após clivagem com TEV e eluição com 260 mM de imidazol (His Trap); 6) Gel filtração.

Fonte: Elaborada pelo autor

A coluna 2 da Figura 3 representa a fração solúvel após o lisado das células bacterianas utilizadas para expressar a *Pf*PKII, no qual é possível observar a banda característica da estrutura MBP-cHT-*Pf*PKII com 126 kDa. Na coluna 3 é possível observar a purificação utilizando a coluna de afinidade MBP Trap, pois a proteína de interesse se apresenta numa maior concentração em comparação aos contaminantes. A coluna 4 representa a lavagem da coluna com tampão sem maltose, evidenciando que a proteína se liga bem na resina de MBP e não é eluída em qualquer condição, facilitando o processo de purificação. Após o processo de purificação com a MBP Trap, a fração eluída, correspondente a coluna 3, foi incubada *overnight* a 4 °C com a TEV protease (MM \approx 40 kDa), visto que a construção do plasmídeo apresenta um sítio de clivagem para a TEV entre a pMAL e cHT-*Pf*PKII (Figura 1). Na coluna 5 observamos duas bandas mais intensas que representam a proteína cHT-*Pf*PKII (MM = 83 kDa) e as proteínas TEV (MM \approx 40 kDa) e MBP (43 kDa), respectivamente. Foi realizada cromatografia de afinidade de níquel utilizando a His Trap (coluna 5,

Figura 3) para aumentar o grau de pureza da amostra que interage com o níquel devido a His-tag presente na construção. Por fim, cromatografia por gel filtração (coluna 6, Figura 3).

A banda da coluna 6 apresenta tamanho compatível com o esperado para a cHT-*Pf*PKII. O estado oligomérico foi confirmado através do cromatograma obtido pela gel filtração (primeiro pico da Figura 4C), cujas frações em estado tetramérico foram selecionadas através dos tubos coletores. Os picos seguintes ao tetrâmero (Figura 4C) representam os estados de dímero e monômero que, por não apresentarem interesse funcional para o projeto, não foram coletados.

A análise do gel de SDS-PAGE e dos cromatogramas evidenciam que o processo de purificação da *Pf*PKII resultou em um grau de pureza adequado para os ensaios cinéticos. Assim, com a *Pf*PKII pura, conduziram-se ensaios para avaliação e verificação dos parâmetros cinéticos e triagem de compostos como candidatos a inibidores da enzima.

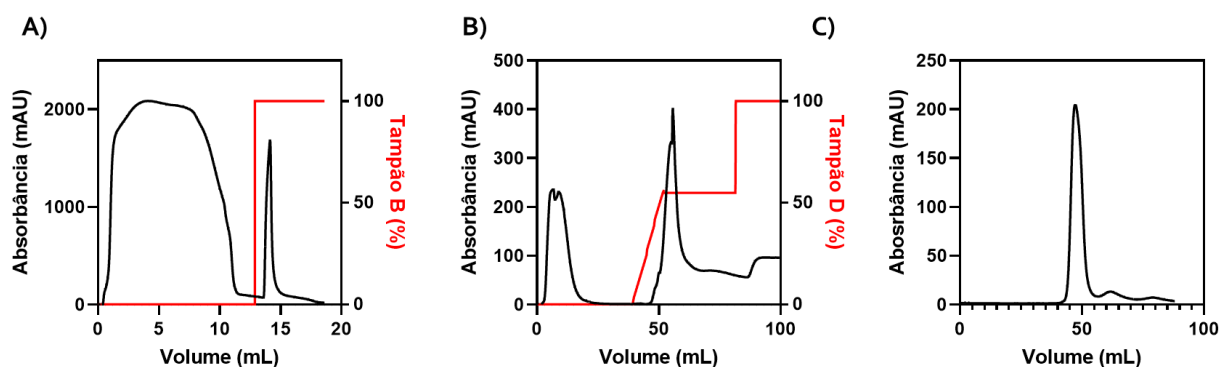


Figura 4 - (A) Cromatograma com a leitura por absorbância a 280 nm na coluna MBPTrap 1 mL; (B) Cromatograma com a leitura por absorbância em 280 nm na coluna de HisTrap 5 mL. (C) Cromatograma com a leitura por absorbância em 280 nm na coluna de gel filtração 16/600 Superdex 200 pg.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.2 Caracterização dos parâmetros cinéticos da piruvato quinase II de *P. falciparum*

Uma vez que a padronização do ensaio foi efetivada, a atividade enzimática da *Pf*PKII através do ensaio acoplado e curvas concentração-resposta com PEP e ADP (Figura 5) para determinação do valor do parâmetro cinético K_M^{App} (constante de Michaelis-Menten aparente, do inglês *apparent*) foi realizada. Através das medidas de luminescência do ensaio acoplado na reação direta de conversão do PEP em piruvato e ADP em ATP, foi possível determinar os valores de K_M^{App} de $(25,4 \pm 0,5) \mu M$ para o PEP e de $(50 \pm 6) \mu M$ para o ADP.

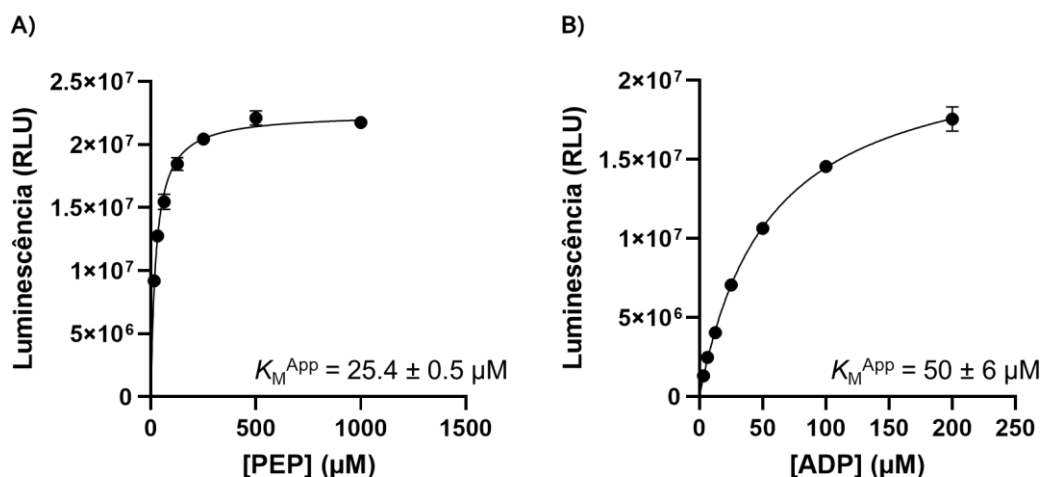


Figura 5 - Curva concentração resposta obtida no ensaio de luminescência utilizado para a determinação do parâmetro cinético K_M^{App} da *PfkPKII* em relação aos substratos (A) fosfoenolpiruvato (PEP) e (B) adenosina difosfato (ADP), $n=2$.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores de cinética encontrados diferem dos já reportados na literatura para a *PfkPKII*, com K_M no ensaio com PEP e ADP de $(0,64 \pm 0,05) \text{ mM}$ e $(0,2 \pm 0,1) \text{ mM}$, respectivamente [10]. A diferença de uma ordem de grandeza pode estar relacionada com o tipo de reação utilizada para os parâmetros cinéticos, visto que os dados reportados por Swift e colaboradores são baseados em uma reação acoplada de formação de NAD^+ na presença da enzima lactato desidrogenase (LDH), conforme a Figura 6. Nesse sentido, a diferença entre os métodos utilizados para medir a atividade da *PfkPKII* é uma hipótese a ser explorada para explicar a incompatibilidade entre os valores nos parâmetros cinéticos.

Com os valores de K_M^{App} obtidos, foi utilizada uma concentração comum de $40 \mu\text{M}$ para ambos PEP e ADP no ensaio para triagem de candidatos a inibidores de *PfkPKII*. A proximidade ao valor de K_M^{App} acarreta na otimização das quantidades de substratos utilizadas sem prejudicar a resposta no ensaio, além da concentração de $40 \mu\text{M}$ ser igual à utilizada para a triagem inicial dos compostos, podendo ser usada para indicativos iniciais do mecanismo de inibição.

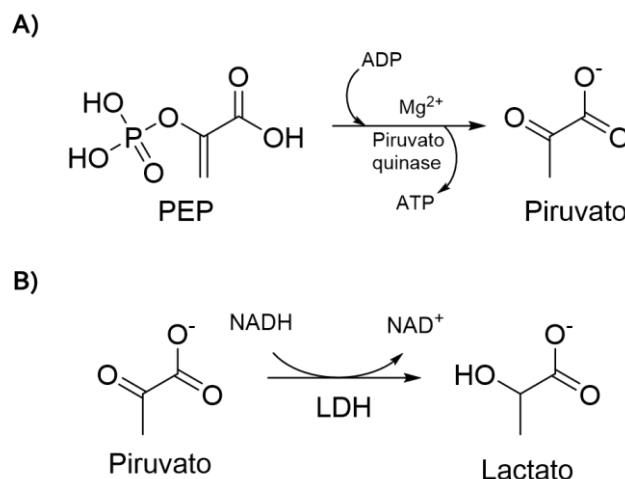


Figura 6 - Esquema reacional do ensaio acoplado utilizado na identificação da atividade enzimática da *Pf*PKII por Swift e cola, 2020. (A) reação de catálise da *Pf*PKII e (B) reação de catálise da lactato desidrogenase (LDH), cuja oxidação do NADH pode ser monitorada através de espectrofotometria no comprimento de onda de 340 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.3 Triagem de compostos candidatos a inibidores da *Pf*PKII com possível atividade antiplasmodial

A *Medicines for Malaria Venture* (MMV) é uma organização sem fins lucrativos fundada em 1999 com o intuito de reduzir as consequências causadas pela malária em países cuja doença é endêmica, descobrindo, desenvolvendo e facilitando a acessibilidade a novos antimaláricos efetivos e seguros. Nesse contexto, desde sua fundação, a MMV auxiliou no desenvolvimento de 15 novos fármacos que estão tratando pacientes e, até o momento, ajudaram a salvar a vida de mais de 3 milhões de pessoas. (17) A MMV disponibiliza “Open Access Boxes” (OAB) que contém compostos com atividade antiparasitária e antibacteriana que podem ser solicitados por pesquisadores para triagem biológica. Atualmente, encontram-se disponíveis para testes cinco OAB: i. *The Pathogen Box*; ii. *The Pandemic Response Box*; iii. *The Global Health Priority Box*; iv. *The Malaria Box* e v. *The Covid Box* que juntos somam 1.600 compostos. (18)

Foram triadas duas bibliotecas do MMV junto ao ensaio acoplado da *Pf*PKII, totalizando 640 compostos. As bibliotecas testadas foram: *The Pathogen Box* (400 compostos) e *The Global Health Priority Box* (240 compostos). A Figura 7 contém os resultados obtidos de atividade enzimática para a triagem inicial desses compostos frente à *Pf*PKII, a uma concentração de 40 μ M.

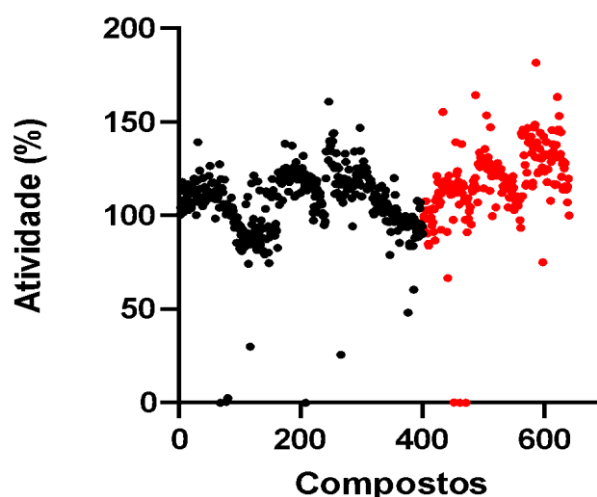


Figura 7 - Gráfico de dispersão indicando a atividade da *PjPKII* frente aos compostos testados. “The Pathogen Box” (preto) e “The Global Health Priority Box” (vermelho).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Das triagens iniciais, 4 compostos da “The Pathogen Box” e 2 da “Global Health Priority Box” apresentaram inibição maior que 50 % (Tabela 1). Os compostos foram selecionados das placas para a realização de uma nova triagem, em duplicata, a fim de confirmar sua inibição. Dos 6 compostos, apenas os compostos **MMV020520** (65 ± 7) % e **MMV228911** (40 ± 10) % tiveram confirmada a porcentagem de inibição obtida na triagem inicial (Figura 7).

Tabela 1 - Inibição percentual dos compostos em ponto único frente ao ensaio acoplado da *PjPKII*.

Biblioteca	Código MMV	Inibição @ 40 μ M (%)
Pathogen Box	MMV020520	70
Pathogen Box	MMV689709	99
Pathogen Box	MMV024114	74
Pathogen Box	MMV228911	52
Global Health Priority Box	MMV1752548	99
Global Health Priority Box	MMV1704710	99

Fonte: Elaborada pelo autor

Os compostos MMV020520 e MMV228911 foram adquiridos através da *Medicines for Malaria Venture* com o intuito de confirmar a capacidade inibitória desses compostos e de determinação dos valores de IC_{50} . No entanto, no momento da realização do ensaio de confirmação os compostos não apresentaram inibição equivalente à observada previamente nos ensaios de triagem

($IC_{50} > 50 \mu M$), sugerindo que os compostos inicialmente disponibilizados demonstraram um falso positivo de inibição no ensaio.

3.4 Ácido tânico como um potente inibidor da *Pf*PKII com possível atividade antiplasmodial

Em 2018, Yang e colaboradores reportaram a ação do ácido tânico (AT), um ácido polifenólico de origem natural, como um inibidor seletivo da piruvato quinase M2 humana (PKM2), atenuando a proliferação do câncer colorretal. O ácido tânico se liga alostericamente à proteína e dissocia o tetrâmero, bloqueando a atividade metabólica da PKM2. (19) Dada a similaridade sequencial de 37 % da PKM2 com a *Pf*PKII, adquiriu-se o AT (Sigma-Aldrich, 403040) visando testar a ação do composto frente à *Pf*PKII (Figura 8A).

A triagem inicial do AT frente a *Pf*PKII indicou 100 % de inibição a $40 \mu M$, sendo selecionado para a subsequente determinação da concentração de AT necessária para inibição de 50 % (IC_{50}) da atividade enzimática da *Pf*PKII, estimada a partir de uma curva concentração-resposta (Figura 8B). O valor de IC_{50} do AT frente a *Pf*PKII foi de $(1,4 \pm 0,5) \mu M$, resultado próximo do reportado contra a PKM2 ($IC_{50} = 1 - 3 \mu M$), confirmando assim, a inibição da enzima homóloga do parasita [19].

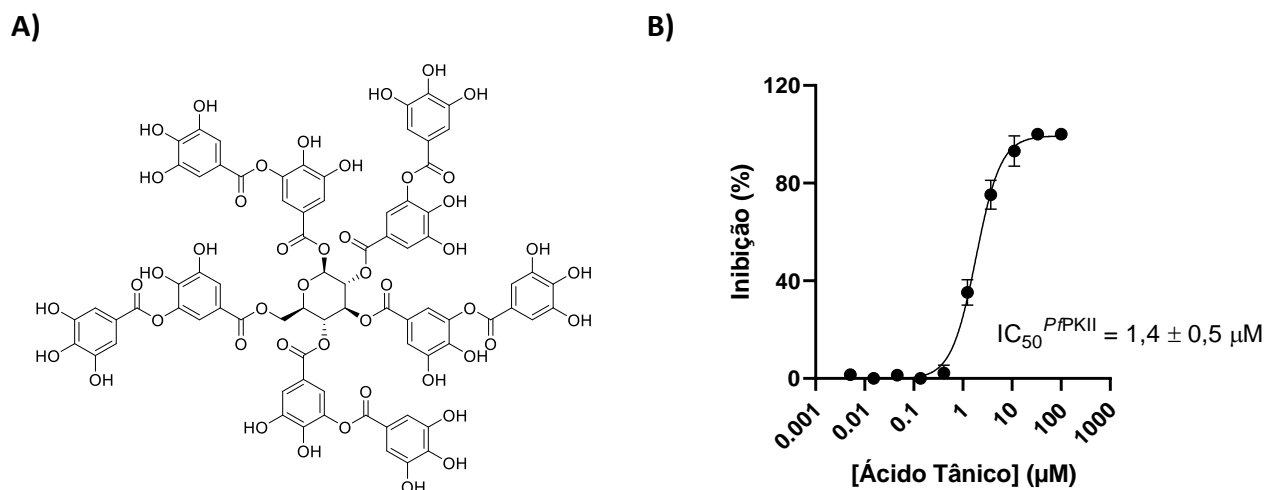


Figura 8 - (A) Estrutura química do ácido tânico ($MM = 1701,2 \text{ g.mol}^{-1}$). (B) Curva de concentração-resposta utilizada para determinação do valor de IC_{50} do ácido tânico frente a *Pf*PKII, $n=2$.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Confirmada a potência do AT frente a *Pf*PKII, as atividades futuras tem como objetivo a caracterização cinética da inibição da enzima pelo AT, comparando o mecanismo na *Pf*PKII com a PKM2 na busca de similaridades. Além disso, o AT apresenta atividade antiviral e antibacteriana,

algo que pode ser explorado em um ensaio biológico *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum*. Caso a atividade antiplasmodial seja reportada, a inibição da PfPKII já é um indício para o estudo futuro dos mecanismos de ação do AT contra o parasito.

3.5 Determinação do mecanismo de inibição do ácido tânico frente a PfPKII

Confirmada a potência inibitória, partiu-se para o estudo do mecanismo de inibição do AT frente a PfPKII. A análise se baseou em curvas de concentração-resposta com os substratos PEP e ADP em presença de diferentes concentrações de ácido tânico, visando avaliar diferenças no comportamento da curva de atividade enzimática (Figura 9). O intuito desta análise foi determinar qual o mecanismo de inibição que o AT tem com a PfPKII.

Há dois tipos principais de inibição enzimática: competitiva e não-competitiva. Na inibição competitiva o substrato e o ligante competem pelo sítio ativo da enzima aumentando o K_M aparente, porém a velocidade máxima permanece igual, visto que grandes concentrações de substrato superam a inibição do ligante. Por outro lado, na inibição não-competitiva o ligante interage com uma região alostérica da enzima, alterando a conformação da enzima e diminuindo a velocidade máxima da reação. O K_M não muda neste tipo de inibição pois o ligante altera a capacidade da enzima de catalisar a reação independente da concentração de substrato, uma vez que a interação se dá fora do sítio ativo. (20)

A Figura 9 revela indícios de uma inibição não-competitiva ao observar que o platô das curvas está diminuindo à medida que a concentração de AT aumenta. Esse argumento é confirmado ao analisar a Figura 10, que contém os valores de K_M^{App} resultantes das análises das curvas acima. Os valores próximos de K_M^{App} na ausência e presença de diferentes concentrações de AT revelam que este pode ligar-se alostericamente à enzima, ocasionando mudanças conformacionais que prejudicam a interação da proteína com seus substratos. Esse resultado reforça hipóteses anteriores já que o AT possui um grande volume espacial em relação aos substratos PEP e ADP e, por sua vez, a interação no sítio ativo seria de difícil acesso.

Com os resultados apontando para a inibição alostérica, foi levantada a hipótese de que o mecanismo de inibição do AT na PKM2 seja o mesmo para a PfPKII. Na PKM2, o AT se liga de forma alostérica ao resíduo K433 e causa uma mudança conformacional que dissocia o tetrâmero em dímeros, reduzindo a atividade glicolítica da enzima [4]. No entanto, é possível observar uma reversão da inibição ao adicionar frutose-1,6-bifosfato (FBP) à reação. O FBP é um comum ativador alostérico

da piruvato quinase, ligando-se à enzima na medida que estabiliza sua conformação tetramérica e aumenta a eficiência funcional.

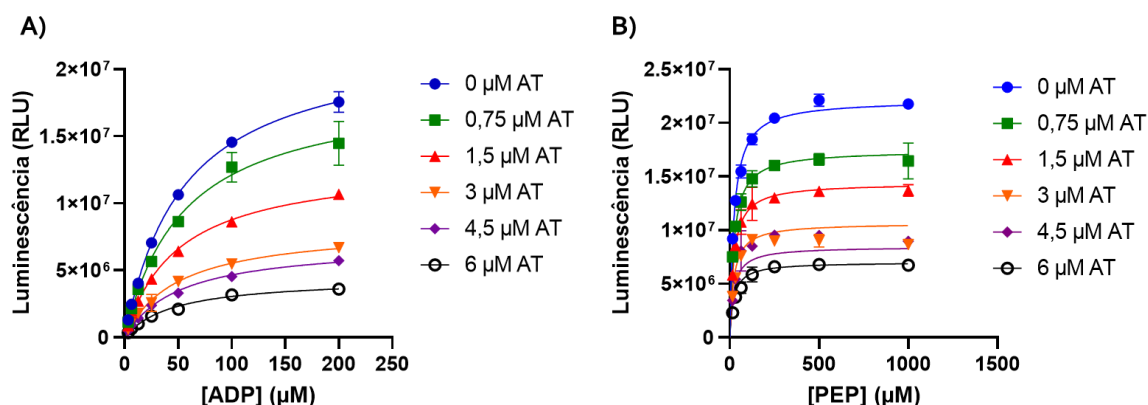


Figura 9 - Curva de concentração-resposta da *PfPKII* para determinação do mecanismo de inibição em relação a diferentes concentrações do ácido tânico. (A) ADP variando e PEP fixo e (B) PEP variando e ADP fixo, n=2.

Fonte: Elaborada pelo autor.

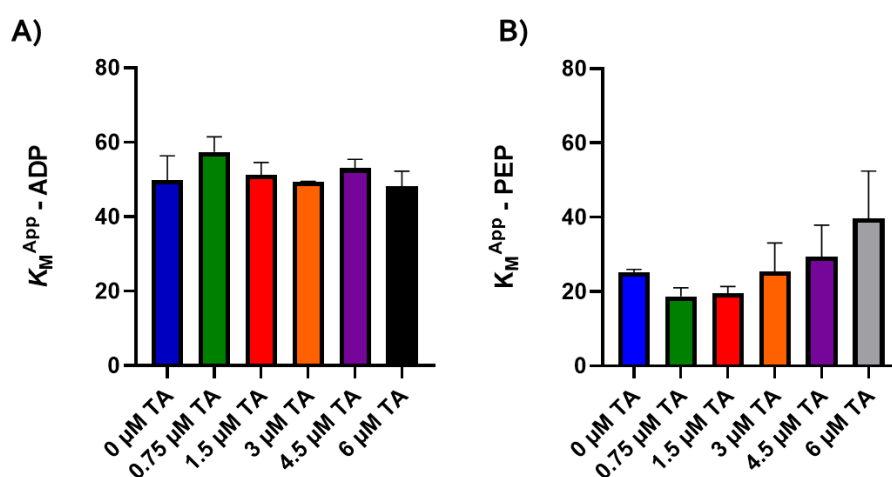


Figura 10 - Valores de K_M^{App} para as curvas de concentração-resposta obtidas na Figura 9. (A) K_M^{App} com relação ao ADP e (B) K_M^{App} com relação ao PEP, n=2.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesse contexto, realizou-se um ensaio de suplementação com FBP na *PfPKII* para entender se o mecanismo de inibição do AT pode ser o mesmo para as duas enzimas. A análise da Figura 10 revela que o FBP não causa diferença na inibição do ácido tânico e na atividade da enzima no geral, indicando que possivelmente não há regulação alostérica da *PfPKII* pelo FBP. Esse resultado corrobora com a função principal da enzima na geração de nucleosídeos trifosfatados (NTP) dado que a piruvato quinase I já satisfaz a atividade glicolítica no parasito, a *PfPKII* pode não necessitar de um ativador alostérico para essa função.

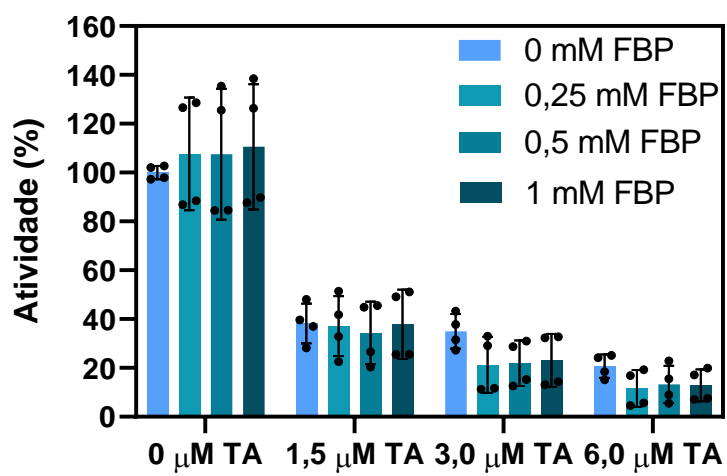


Figura 11 - Ensaio de atividade da *PfPKII* com suplementação de frutose-1,6-bifosfato (FBP) em presença de diferentes concentrações de ácido tânico.

Fonte: Elaborada pelo autor

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por fármacos antimaláricos com mecanismos diferentes dos disponíveis atualmente é de extrema importância para o combate à malária. O intuito do trabalho foi encontrar inibidores para uma enzima pouco explorada, cuja inibição possa trazer um modo de ação alternativo e específico no parasito. Para isso, a proteína *PfPKII* foi inicialmente expressa e purificada utilizando métodos de biologia molecular e cromatografia. A expressão do vetor disponibilizado pelo Prof. Dr. Sean Prigge, contendo a sequência codificante otimizada para *PfPKII*, foi realizada de forma eficiente e reprodutível. Após os processos cromatográficos, a proteína recombinante foi obtida com pureza e função biológica adequadas.

A determinação da constante de Michaelis-Menten aparente K_M^{App} , para ambos os substratos PEP e ADP, confirmou que a enzima produzida de modo heterólogo era adequada para o início dos ensaios biológicos e triagem de candidatos a inibidores. Em seguida, foram triadas duas coleções de compostos da MMV (*The Pathogen Box* e *The Global Health Priority Box*), totalizando 640 candidatos a inibidores. Essa etapa da pesquisa levou a identificação de dois compostos com inibição satisfatória (MMV020520 e MMV228911) que foram adquiridos para confirmação da atividade inibitória. Contudo, a reavaliação de um novo lote dos dois compostos indicou baixa atividade inibitória nas condições de ensaio, sugerindo que a inibição observada inicialmente poderia ser devido aos produtos da degradação das amostras na placa disponibilizada.

Devido a necessidade de um controle positivo de inibição, identificou-se na literatura o ácido tânico (AT) como inibidor da enzima homóloga humana (PKM2). O AT foi adquirido e avaliado contra a *PfPKII*, apresentando potência inibitória na faixa do baixo micro molar. Posteriormente, foram realizados ensaios cinéticos para determinar o mecanismo de inibição do AT na *PfPKII*. As análises revelaram que o ácido tânico é um inibidor não-competitivo em relação aos substratos PEP e ADP, interagindo em um sítio alostérico na enzima. O resultado levou ao questionamento se o mecanismo de ação do AT na enzima homóloga humana seria conservado para a *PfPKII*. Para sanar isso, foram realizados ensaios de suplementação com frutose-1,6-bifosfato (FBP) em presença de AT, visando observar qualquer alteração na inibição da *PfPKII*. Os ensaios revelaram que o FBP, comumente um ativador alostérico de piruvato quinases, não alterou a atividade da *PfPKII* nem a inibição do AT, portanto o modo de inibição do AT na *PfPKII* é diferente do já reportado na literatura para a piruvato quinase humana.

A elucidação estrutural da *PfPKII* é uma etapa que pode auxiliar tanto na compreensão do mecanismo de inibição do AT frente a *PfPKII*, quanto no processo de planejamento de inibidores através de

ferramentas computacionais, como docagem e simulações de dinâmica molecular. Nesse contexto, como perspectiva de futuro, planeja-se resolver a estrutura tridimensional da *Pf*PKII através da cristalografia de proteínas ou com o uso da técnica de criomicroscopia eletrônica. Por outra perspectiva, independente da elucidação estrutural, serão conduzidos mais ensaios biofísicos para estudar o mecanismo de ação do AT na *Pf*PKII. Outras análises subsequentes envolvem triagens fenotípicas *in vitro* do AT frente ao parasito, buscando confirmar sua atividade antiplasmodial e correlaciona-la com a inibição na enzima *Pf*PKII.

REFERÊNCIAS

- 1 WORLD HEALTH ORGANIZATION. *World malaria report 2022*. 2023. Disponível em: <https://www.wipo.int/amc/en/mediation/>. Acesso em: 23 jan. 2024
- 2 TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, v. 17, n. 10. p. 1217–1220, Oct. 2011. DOI: 10.1038/nm.2471.
- 3 WOODROW, C. J.; WHITE, N. J. The clinical impact of artemisinin resistance in Southeast Asia and the potential for future spread. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 1, p. 34–48, Jan. 2017. DOI: 10.1093/femsre/fuw037.
- 4 VIVAS, L. *et al.* Plasmodium falciparum: stage specific effects of a selective inhibitor of lactate dehydrogenase. *Experimental Parasitology*, v. 111, n. 2, p. 105–114, Oct. 2005. DOI: 10.1016/j.exppara.2005.06.007.
- 5 ROBIEN, M. A. *et al.* Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Plasmodium falciparum at 2.25 Å resolution reveals intriguing extra electron density in the active site. *Proteins: structure, function, and bioinformatics*, v. 62, n. 3, p. 570–577, Feb. 2006. DOI: 10.1002/prot.20801.
- 6 SATCHELL, J. F. *et al.* Structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Plasmodium falciparum. *Acta Crystallographica D*, v. 61, n. 9, p. 1213–1221, Sept. 2005, DOI: 10.1107/S0907444905018317.
- 7 BRADY, R.; CAMERON, A. Structure-based approaches to the development of novel anti-Malarials. *Current Drug Targets*, v. 5, n. 2, p. 137–149, Feb. 2004. DOI: 10.2174/1389450043490587.
- 8 PARTHASARATHY, S. *et al.* Structure of the Plasmodium falciparum triosephosphate isomerase–Phosphoglycolate complex in two crystal forms: characterization of catalytic loop open and closed conformations in the ligand-bound state. *Biochemistry*, v. 41, n. 44, p. 13178–13188, Nov. 2002. DOI: 10.1021/bi025783a.
- 9 MAEDA, T. *et al.* Pyruvate kinase type-II isozyme in Plasmodium falciparum localizes to the apicoplast. *Parasitology International*, v. 58, n. 1, p. 101–105, Mar. 2009. DOI: 10.1016/j.parint.2008.10.005.
- 10 SWIFT, R. P. *et al.* The NTP generating activity of pyruvate kinase II is critical for apicoplast maintenance in Plasmodium falciparum. *Elife*, v. 9, Aug. 2020. DOI: 10.7554/eLife.50807.
- 11 GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estudos Avançados*, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010. DOI: 10.1590/S0103-40142010000300006.
- 12 DRWAL, M. N.; GRIFFITH, R. Combination of ligand-and structure-based methods in virtual screening. *Drug Discovery Today: technologies*, v. 10, n. 3, p. e395–e401, 2013.
- 13 SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: CSHL Press, 2001. 3v.

- 14 MALUF, F. V. *Estudos estruturais e de química medicinal aplicados às enzimas da via glicolítica de protozoários: enolase de Plasmodium falciparum e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi*. 2015. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. DOI: 10.11606/T.76.2015.tde-02102015-093453.
- 15 MOHAMMADI, S.; NIKKHAH, M.; NAZARI, M.; HOSSEINKHANI, S. Design of a coupled bioluminescent assay for a recombinant pyruvate kinase from a thermophilic *Geobacillus*. *Photochemistry and Photobiology*, v. 87, n. 6, p. 1338–1345, Nov. 2011. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2011.00973.x.
- 16 MICHAELIS, V. L.; MAUD MENTEN, M. L.; GOODY, R. S.; JOHNSON, K. A. (1890) 57, 834. 6 A. J. Brown, 1902.
- 17 BATHURST, I.; HENTSCHEL, C. Medicines for Malaria Venture: sustaining antimalarial drug development. *Trends in Parasitology*, v. 22, n. 7, p. 301–307, 2006.
- 18 MEDICINES FOR MALARIA VENTURE. MMV - Open Initiatives Boxes. Disponível em: <https://www.mmv.org/mmv-open>. Acesso em: 15 fev. 2024.
- 19 YANG, P. *et al.* Tannic acid directly targets pyruvate kinase isoenzyme M2 to attenuate colon cancer cell proliferation. *Food & Function*, v. 9, n. 11, p. 5547– 5559, Nov. 2018. DOI: 10.1039/c8fo01161c.
- 20 SABOURY, A. A. Enzyme inhibition and activation: a general theory. *Journal of the Iranian Chemical Society*, v. 6, p. 219–229, 2009.