

# SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE TRIPANOSSOMATÍDEOS COMO POTENCIAIS ALVOS QUIMIOTERÁPICOS

Melos, J. L. R.; Echevarria, A.

## Resumo

Doenças causadas por tripanossomatídeos são, há muito tempo, conhecidas. Esses parasitos apresentam como peculiaridade a alternância de formas nos vetores e em seus hospedeiros, com morfologia, bioquímica e maneiras de escape bem diferenciadas. O conhecimento de estudos recentes, fundamentalmente sobre as vias metabólicas usadas por esses parasitos, apresenta grande interesse científico, especificamente, nas divergências entre as rotas metabólicas de hospedeiros humanos e desses parasitos. Desta forma, a via de obtenção de energia (via glicolítica), biossíntese de poliaminas, biossíntese de esteróis, biossíntese de microtúbulos, metabolismo do folato, e ainda, as enzimas DNA topoisomerases, tripanotiona redutase, hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, óxido nítrico sintase, arginase, cisteína protease e superóxido dismutase revelam-se importantes alvos para novos fármacos antitripanossomatídeos.

**Palavras-chave:** *tripanossomatídeos; alvos quimioterápicos; sistemas enzimáticos.*

## TRYPANOSOMATIDS METABOLIC SYSTEMS AS POTENTIAL CHEMOTHERAPEUTIC TARGETS

## Abstract

Trypanosomatids diseases are well known for a long time. These blood-borne parasites peculiarly present vector and host alternating forms with well-differentiated biochemistry, morphology and ways to escape. Recent studies about the metabolic ways used by these parasites are of great scientific interest, especially the divergence of parasite and human host metabolic pathways. Thus, the obtaining of energy (glycolytic pathway), polyamine biosynthesis, sterol biosynthesis, microtubule biosynthesis, folate metabolism, and the DNA to-

poisomerase, trypanothione reductase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, nitric oxide synthase, arginase, cysteine protease, and superoxide dismutase enzymes have proved to be important targets to new anti-trypanosomal agents.

**Palavras Chaves:** *trypanosomatids; chemotherapeutic targets; enzymatic systems.*

\* Departamento de Química – ICE – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – 23.890-000, Seropédica, RJ.  
E-mail para correspondência: echevarr@ufrj.br

1. Introdução
2. Alvos quimioterápicos
3. Principais vias metabólicas e enzimas como potenciais alvos quimioterápicos em tripanossomatídeos
4. Conclusões

## 1. INTRODUÇÃO

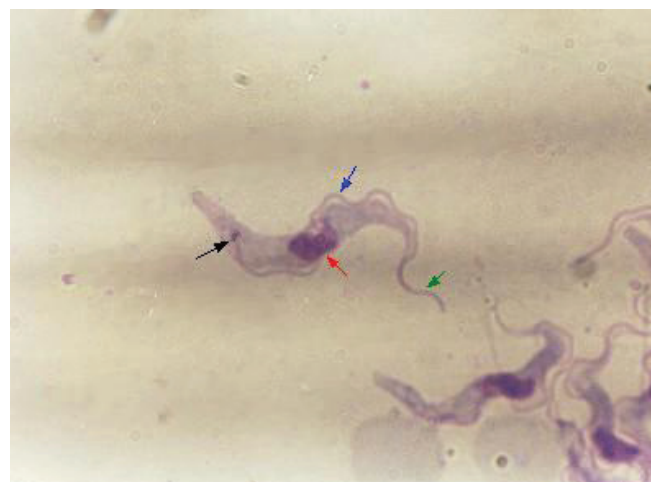
As doenças parasitárias, intestinais e não-intestinais, estão entre as mais prevalentes do mundo, atingindo milhões de pessoas. Dados recentes indicam que mais de 24 milhões de pessoas estão infectadas ou são sorologicamente positivas apenas para o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A prevenção destas doenças depende de medidas ecológicas e sanitárias que correspondem, por exemplo, ao controle dos insetos vetores, do sangue e hemoderivados, leite materno de mães contaminadas, polpa de frutas e caldo de cana e das condições de habitação.<sup>1,2</sup> No passado, indivíduos eram tratados com produtos extraídos de plantas, por administração oral, pois se acreditava que o sítio das infecções fosse apenas o trato intestinal. O atual conhecimento de anatomia, bioquímica, fisiologia e ainda, de quase todas as etapas do ciclo de vida dos parasitos no homem, tem possibilitado o processo de planejamento de fármacos de forma mais racional, com ênfase no mecanismo de ação, visando atingir os alvos específicos e essenciais dos parasitos e assim poupar seu hospedeiro humano.<sup>3</sup>

Entre as doenças parasitárias não-intestinais mais importantes destacam-se as causadas por parasitos dos gêneros *Trypanosoma* (doença de Chagas e doença do sono) e *Leishmania* (leishmaniose visceral, mucocutânea, e cutânea). Esses parasitos pertencem ao filo Euglenozoa, da classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, subordem Trypanosomatina. Durante seu ciclo de vida, os parasitos do gênero *Trypanosoma* apresentam-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigota) e aflagelada (amastigota). No homem e nos animais vertebrados (tatus, macacos, gambás etc.), o tripomastigoto tem por habitat o meio circulante, e o amastigoto, os tecidos. Nos triatomíneos, inseto vetor da doença de Chagas, além das formas amastigotas e tripomastigotas, observa-se a forma de transição epimastigota. Já os parasitos do gênero *Leishmania* existem em duas formas: promastigota e amastigota. A forma promastigota é flagelada e extracelular e infecta seres humanos e outros vertebrados, vivendo também no trato digestivo do inseto vetor, os flebotomíneos. A forma amastigota é desprovida de movimento e localiza-se nos macrófagos dos hospedeiros.<sup>4</sup> Segundo Vickerman,<sup>5</sup> a característica principal desses protozoários é a presença de um cinetoplasto localizado na base do flagelo, que contem o DNA mitocondrial (Figura 1). A subordem Trypanosomatina contém uma única família Trypanosomatidae, que por sua vez, além dos gêneros citados apresenta ainda os seguintes gêneros: *Endotrypanum*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas*, *Herpetomonas* e *Phytomonas*. Nos últimos anos, as pesquisas vêm priorizando a identificação de alvos enzimáticos vitais para os parasitos. Particularmente, na família Trypanosomatidae, os alvos enzimáticos mais estudados, visando a quimioterapia, são as enzimas da via glicolítica, enzimas de rotas biossintéticas e as enzimas óxido nítrico sintase, arginase, superóxido dismutase, tripanotiona redudase, DNA topoisomerases, cisteína protease e hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase.<sup>5</sup>

As enzimas da via glicolítica são alvos promissores para novos fármacos para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos porque suas ações são essenciais na função de suprimento de ATP.<sup>6</sup> Dentre as enzimas correlacionadas com as rotas biossintéticas, destacam-se as enzimas mediadoras da síntese de espermidina, visto que os tripa-

nossomatídeos dependem desta poliamina para o seu crescimento e sobrevivência.<sup>7</sup>

A enzima óxido nítrico sintase atua produzindo citrulina e óxido nítrico a partir de o aminoácido L-arginina, em magrofágos, sendo a produção de óxido nítrico uma importante resposta microbicida dessas células aos seus invasores. A enzima arginase, mais recentemente, vem despertando a atenção dos pesquisadores, pois compete com a enzima óxido nítrico sintase pelo substrato L-arginina. Os parasitos modulam a resposta das células hospedeiras através da ativação da arginase. Este mecanismo leva a depleção de L-arginina, com consequente alteração da produção de óxido nítrico pelo hospedeiro e aumento da produção de poliaminas essenciais ao crescimento e diferenciação parasitários.<sup>8</sup>



**Figura 1.** *Trypanosoma* sp na forma tripomastigota; Seta preta – cinetoplasto; vermelha – núcleo; azul – membrana ondulante; verde – flagelo ([www.ufrgs.br/para-site/siteantigo](http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo)).

## 2. AS ENZIMAS COMO ALVOS QUIMIOTERÁPICOS

O desenvolvimento de novos agentes antiparasitários, de maneira geral, tem sido realizado considerando-se os seguintes itens: a) o conhecimento de princípios ativos de plantas utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças parasitárias; b) a investigação de fármacos já utilizados para o tratamento de outras doenças, uma vez que foram já submetidos a ensaios clínicos muito dispendiosos e c) a identificação de alvo específico em via metabólica-chave para o parasito. Estudos recentes identificaram alvos potenciais em tripanossomatídeos, que incluem enzimas importantes em várias vias metabólicas, como por exemplo, a via glicolítica, o metabolismo de esteróis, a síntese

do DNA, entre outras.<sup>9</sup>

A morte do parasito por inibição de uma enzima ou via metabólica, que é essencial para sua sobrevivência e não-essencial para o hospedeiro, requer a exploração de diferenças entre essas vias ou enzimas. Alternativamente, a exploração quantitativa dessas diferenças no metabolismo e na seleção de vias ou enzimas, que exercem um alto nível de controle metabólico no parasito e um baixo nível de controle metabólico no hospedeiro, são fatores que determinam a especificidade e consequentemente a eficácia do fármaco a ser planejado.<sup>10</sup>

### 3. PRINCIPAIS VIAS METABÓLICAS E ENZIMAS COMO POTENCIAIS ALVOS QUIMIOTERÁPICOS EM TRIPANOSOMATÍDEOS

As principais vias metabólicas e enzimas estudadas como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antiparasitária frente aos tripanossomatídeos são: a) enzimas da via glicolítica; b) enzimas da biossíntese de poliaminas; c) enzimas da biossíntese de esteróis; d) enzimas do metabolismo do folato; e) enzimas da biossíntese de microtubúlos; f) DNA topoisomerase; g) tripanotiona redutase; h) hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase; i) óxido nítrico sintase; j) arginase; k) cisteína protease e l) superóxido dismutase.

#### AS ENZIMAS DA VIA GLICOLÍTICA

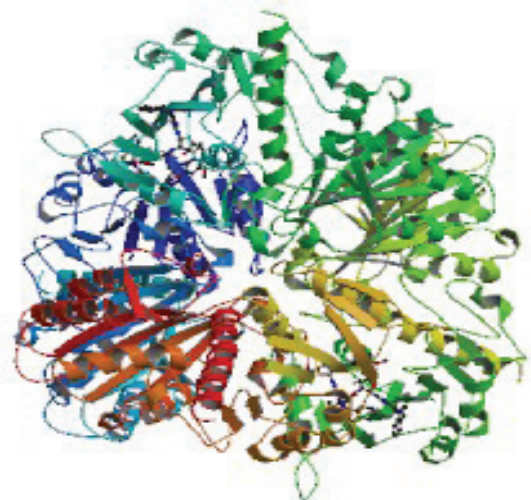
Tripanossomatídeos são altamente dependentes da glicólise para a produção de ATP, e como muitas enzimas glicolíticas apresentam características próprias, elas foram consideradas como potenciais alvos para novos agentes quimioterápicos. Desta forma, a maioria dos estudos realizados e relatados na literatura envolve as enzimas de tripanossomatídeos: frutose-1,6-difosfato aldolase, triosefosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, piruvato quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase.<sup>11</sup>

Dentre as enzimas da via glicolítica de tripanossomatídeos, a que vem despertando maior interesse é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH, **Figura 2**). Esta enzima catalisa a fosforilação oxidativa de D-gliceraldeído-3-fosfato

em 1,3-bisfosfoglicerato na presença de NAD<sup>+</sup> e fosfato inorgânico. As formas tripomastigotas de *T. cruzi*, por exemplo, são altamente dependentes da glicólise para a produção de ATP, e como muitas enzimas glicolíticas apresentam características próprias, revelam-se como importantes alvos de novos agentes antiparasitários.<sup>12</sup>

Estudos do metabolismo de *T. brucei* mostraram que a forma tripomastigota utiliza a glicólise como sua única fonte de obtenção de energia. Posteriormente, Engel e colaboradores, mostraram que a forma amastigota de *T. cruzi*, *in vitro*, possui metabolismo essencialmente glicolítico, e que adquire a habilidade de oxidar substratos, tais como aminoácidos, somente após a diferenciação para a forma epimastigota.<sup>14</sup>

Nos tripanossomatídeos, o metabolismo parcial de carboidratos, incluindo a glicólise, é compartimentalizado em organelas específicas denominadas glicossomas. A biogênese destas organelas e a correta compartimentalização de enzimas glicolíticas é assim essencial para esses parasitos. A biogênese ocorre via processos que envolvem proteínas chamadas peroximas que apresentam, por sua vez, baixo nível de identidade com a correspondente humana.<sup>15,16</sup> Desta forma, as peroximas constituem-se, também, um alvo em potencial.



**Figura 2.** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) de *L. mexicana* em complexo com inibidor.<sup>17</sup> (<http://www.pdb.org/pdb/home/home>)

A enzima GADPH extraída dos parasitos *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. mexicana* teve sua estrutura elucidada e apresentou 45-48% de homologia em relação à en-

zima humana. A GADPH foi extraída dos três parasitos diferentes e mostrou 80-90% de semelhança entre si.<sup>11</sup>

A alta dependência da via glicolítica para a obtenção de energia pelos tripanossomatídeos, a organização particular das enzimas dessa via no gliossomo e a ocorrência de características únicas tanto estruturais quanto no mecanismo de muitas enzimas envolvidas na glicólise oferece uma série de oportunidades para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas. Esse conjunto de características explica o motivo pelo qual as enzimas da via glicolítica se tornam alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos.<sup>18-21</sup>

Entretanto, estudos recentes indicam que a maioria dos tripanossomatídeos desenvolve um estilo de sobrevivência com mudanças morfológicas complexas na sua passagem por um ou mais hospedeiros vertebrados e um hospedeiro hematófago, de maneira que esses parasitos respondem a essas alterações morfológicas com alterações metabólicas, incluindo a adaptação do seu metabolismo de lipídeos e, principalmente, de obtenção de energia.<sup>22</sup>

## ENZIMAS DA BISSÍNTESE DE POLIAMINAS

As poliaminas atuam regulando o crescimento e diferenciação celular. Na síntese destas moléculas, encontra-se a ação de duas enzimas de fundamental importância: a ornitina descarboxilase e a S-adenosil-L-metionina descarboxilase.<sup>23</sup> As poliaminas funcionam como substrato para a tripanotiona redutase na síntese da tripanotiona. Os tripanossomatídeos utilizam a via tripanotiona/tripanotiona redutase para realizar o balanço redox de fundamental importância para esses parasitos.<sup>24</sup>

Nos mamíferos este balanço redox é realizado via glutatona/glutationa redutase, sendo equivalente ao sistema tripanotiona/tripanotiona redutase dos tripanossomatídeos.<sup>25</sup>

Tripanossomatídeos dependem, ainda, da espermidina para crescimento e sobrevivência. As poliaminas espermidina e espermina (Figura 3) atuam, também, no empacotamento do DNA e são necessárias em grandes quantidades nas células em processo de multiplicação.<sup>7</sup>

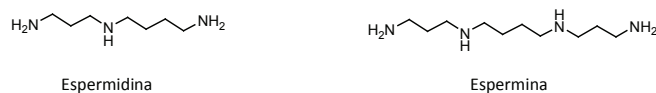
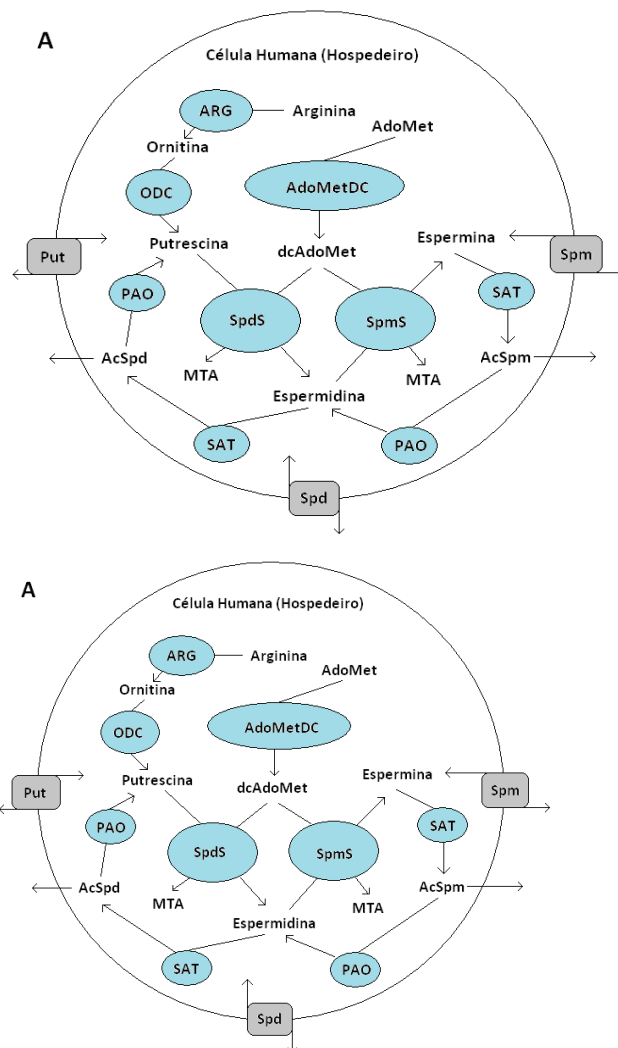
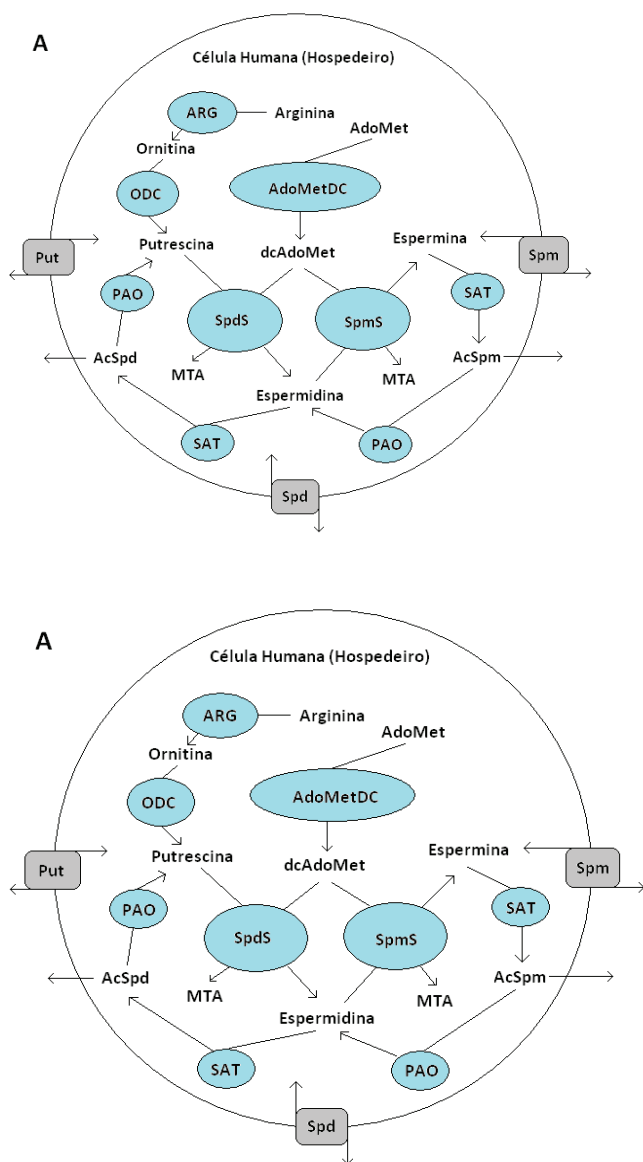


Figura 3. Estruturas das poliaminas espermidina e espermina.

As enzimas envolvidas na biossíntese da espermidina são as seguintes: arginase, integrante do ciclo da uréia (Krebs-Henseleit); ornitina descarboxilase (ODC); S-adenosil-L-metionina sintase (AMDC); espermidina sintase; tripanotiona sintase e tripanotiona redutase (Figura 4). Assim, a inibição dessas enzimas é alvo em potencial para o desenvolvimento de fármacos com atividade antiparasitária.<sup>25</sup>





**Figura 4.** Transporte, biossíntese, interconversão e utilização de poliaminas em células de parasitos e do hospedeiro humano, adaptado de Heby e colaboradores.<sup>25</sup> As abreviações correspondem a:

AcSpd: espermidina acetilada; AcSpm: espermina acetilada; AdoMet: S-adenosilmetionina; AdoMetDC: adenosilmetionina descarboxilase, ARG: arginase; dcAdoMet: S-adenosilmetionina descarboxilada; GHS: glutatión-lespermidina sintase; MTA: 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina; ODC: ornitina descarboxilase; PAO: poliamina oxidase; Put: putrescina; ROS: espécie reativa de oxigênio; SAT: espermidina/espermina N-acetiltransferase, Spd: espermidina; Spm: espermina; TryR: tripanotona redutase e TryS: tripanotona sintase.

A enzima arginase é essencial para a produção da poliamina precursora da ornitina em muitos tipos de células, mas não em *T. cruzi*. A Figura 4-A mostra que em células humanas, as descarboxila-

ses (ODC e AdoMetDC) são altamente reguladas e possuem meia-vida curta, entretanto, as sintases (SpdS e SpmS) são expressas constitutivamente. As enzimas SAT e PAO proveem de uma via para retroconversão da espermidina para putrescina via seus intermediários acetilados (AcSpm e AcSpd).

O transporte de poliamina pode regular seu nível intracelular. Na Figura 4-B observa-se que em *T. brucei*, as enzimas ODC e AdoMetDC possuem meia vida longa e SpdS é perene. Esses organismos conjugam espermidina e glutatión (GSH), usando duas enzimas (GSS e TryS) para formar a tripanotona, quando envolve a defesa química e o estresse oxidativo (destaque em vermelho). Na Figura 4-C, observa-se em *L. donovani* que as enzimas que catalisam a síntese de poliaminas e tripanotona são similares ao de *T. brucei*, mas os parasitos do gênero *Leishmania* possuem um sistema de transporte de poliaminas (POT1). Finalmente, na Figura 4-D os parasitos *T. cruzi* não possuem a enzima ODC, mas AdoMetDC e suas aminopropiltransferases estão presentes.<sup>25</sup>

## ENZIMAS DA BIOSÍNTESE DE ESTERÓIS

O conhecimento sobre a síntese de esteróis em fungos levou à possibilidade de interferência nesta via em tripanossomatídeos.<sup>26</sup> Os tripanossomatídeos, como por exemplo o *T. cruzi*, de forma similar aos fungos, sintetizam ergosterol, mas não colesterol. Assim, neste parasito, etapas da biossíntese de esteróis que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos, que sintetizam o colesterol, (Figura 5), são intensamente estudadas como alvo quimioterápico pelo grupo de Urbina.

Em especial, devem-se observar os recentes estudos realizados com as enzimas hidroximetilglutaril-coenzima A redutase, esqualeno epoxidase, C14 $\alpha$ -esterol desmetilase e esteroil 24-C-metiltransferase.<sup>27</sup>

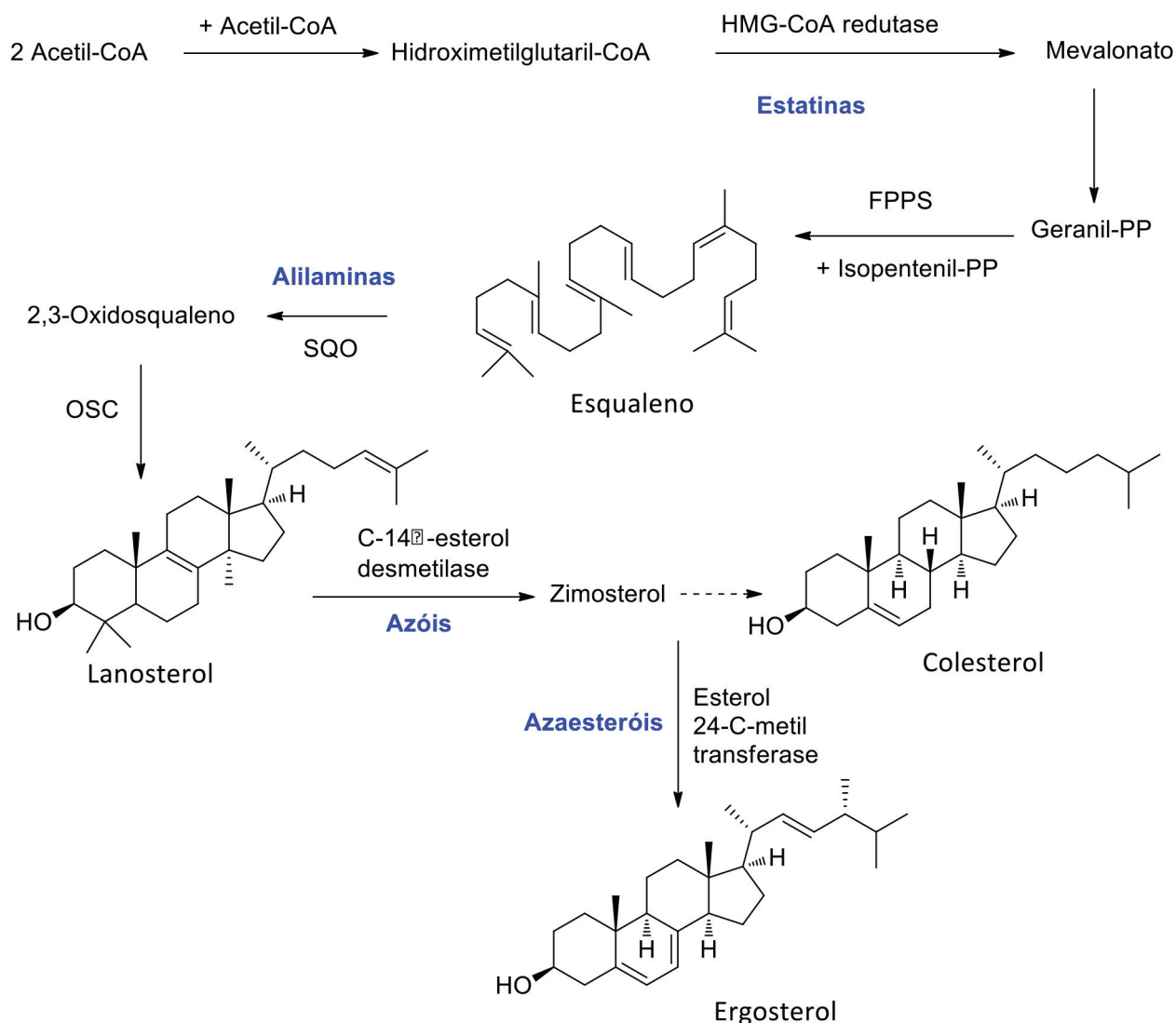
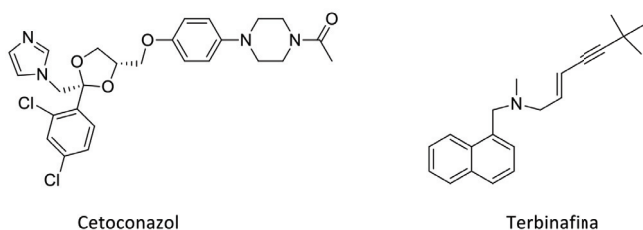


Figura 5. Via da síntese de esteróis de acetato até ergosterol, adaptado de Zacchino.<sup>28</sup>

A enzima HMG-CoA (3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A) redutase catalisa a redução do NADPH dependente de HMG-CoA para mevalonato. Ensaios com a estatina lovastatina evidenciaram que essa molécula atua como um inibidor competitivo desta enzima em formas epimastigotas de *T. cruzi*, que é primariamente localizada em sua mitocôndria.<sup>29</sup> A mesma lovastatina em combinação com cetoconazol, um azol que é utilizado como agente antifúngico, ou a terbinafina uma alilamina, se mostrou ativa tanto in vitro quanto in vivo sobre o parasito, sendo observado na forma epimastigota a inibição da incorporação de acetato marcado com <sup>14</sup>C em esteróis, e a reversão do efeito antiproliferativo pelo esqualeno.<sup>30</sup> A estatina fluvastatina é um importante inibidor competitivo da HMG-CoA, enquanto que a cerivastatina atua por um processo bimodal, característico de um inibidor do tipo lento e com ligação forte.<sup>31</sup>



A Figura 6 mostra as estruturas das estatinas, do cetoconazol e terbinafina.

A enzima esqualeno epoxidase catalisa a conversão de esqualeno a 2,3-óxidoesqualeno, e a terbinafina se mostrou um potente e importante inibidor desta enzima em fungos.<sup>32</sup> Em *T. cruzi*, a terbinafina mostrou atividade significativa, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.<sup>33</sup>

A C14 $\alpha$ -esterol desmetilase catalisa a desmetilação do carbono 14 do anel D da molécula do lanosterol levando a zimosterol, conforme a Figura 6. O cetoconazol, um imidazol, foi capaz de induzir um acúmulo de C14 $\alpha$ -esteróis em *T. cruzi* na forma epimastigota, todavia não foi capaz de eliminar o parasito *in vivo* durante a infecção aguda ou crônica ou ainda de interromper o progresso da doença. Outros compostos contendo o anel triazol ao invés do anel imidazol, inibidores da C14 $\alpha$ -esterol desmetilase, além do cetoconazol, foram ensaiados com relativo sucesso; dentre os quais se destacam: albaconazol, ravuconazol e posaconazol (Figura 7).<sup>34</sup>

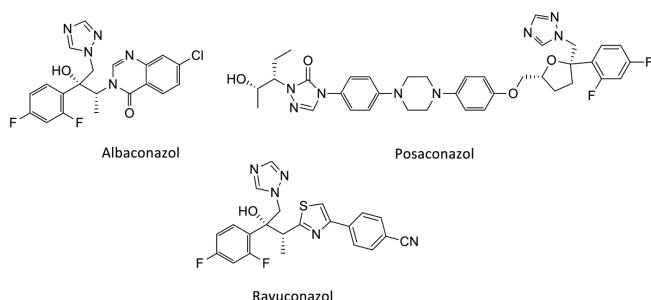


Figura 7. Estruturas do albaconazol, ravuconazol e posaconazol.

A enzima esterol 24-C-metiltransferase catalisa a transferência de um grupo metila de S-adenosilmetionina para o carbono 24 de esteróis  $\Delta$ , tais como zimosterol com ligação dupla na cadeia lateral, levando à formação de esteróis  $\Delta^{24,28}$ . Uma série de azaesteróis foi ensaiada frente à *Leishmania* sp e *T. cruzi* apresentando atividade significativa indicando sua ação sobre a inibição da enzima esterol 24-C-metiltransferase, destacando-se o 22,26-azaesterol com  $IC_{50} = 0,028 \mu M$  e, também, como potente inibidor, *in vitro*, do crescimento de *L. amazonensis* (Figura 8).<sup>35</sup> Posteriormente, diversos derivados do 22,26-azaesterol foram avaliados frente a enzima esterol 24-C-metiltransferase, destacando-se o derivado com modificação na posição do átomo de nitrogênio do anel piperidina com  $IC_{50} = 0,1 \mu M$ , e com significativa inibição do

crescimento de *L. donovani* e *T. cruzi*.<sup>36</sup> Mais recentemente, derivados esteroidais com grupamentos amido e amino em substituição ao anel piperidina do 22,26-azaesterol foram sintetizados e avaliados quanto a inibição da enzima esterol 24-C-metiltransferase, mostrando-se menos ativos, porém, de maneira geral, com atividade inibitória frente à *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. donovani* com melhores resultados para os derivados substituídos no nitrogênio amínico.<sup>37</sup>

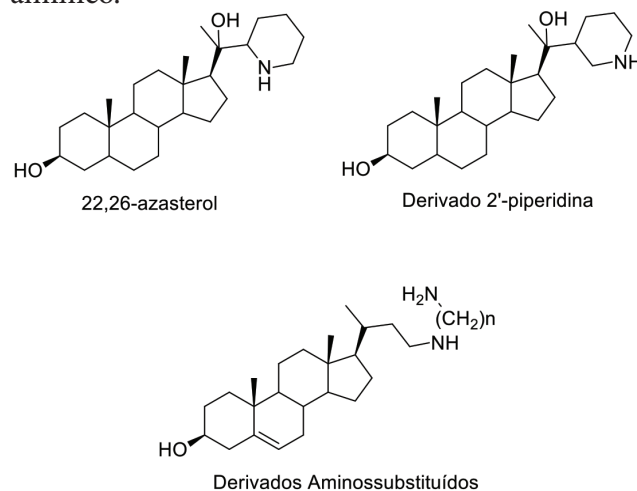


Figura 8. Estrutura do 22,26-azaesterol e derivados.

## ENZIMAS DO METABOLISMO DOS FOLATOS

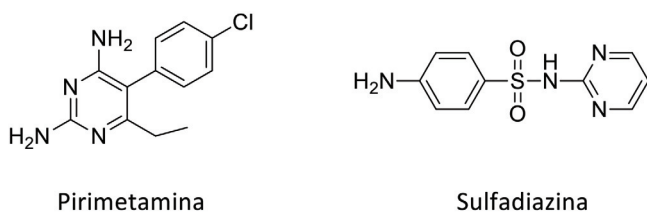
A enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), da via dos folatos (Figura 9), faz a redução do ácido di-hidrofílico a ácido tetra-hidrofílico, usando NADPH como cofator. Esta via ainda não é bem definida em tripanossomatídeos e é uma das mais estudadas na atualidade, pois muitos pesquisadores investigam compostos que atuem inibindo a enzima di-hidrofolato redutase com eficácia prejudicando, assim, este metabolismo.<sup>38</sup>



Figura 9. Estrutura cristalográfica da enzima di-hidrofolato redutase-timidilato sintase de *Trypanosoma cruzi*39 (<http://>

www.pdb.org/pdb/home/home).

A inibição da via dos folatos impede a formação do tetra-hidrofolato, que é essencial para a síntese das bases nitrogenadas, sendo que a deficiência desses compostos purínicos e pirimidínicos pode levar a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas.<sup>40</sup> O tetrafolato também está envolvido na síntese dos aminoácidos: serina e metionina. Assim, muitos fármacos que inibem a DHFR (**Figura 10**) são utilizados na terapia anticâncer e outros como antibióticos ou agentes antitripanossomatídeos.<sup>41</sup>



**Figura 10.** Fármacos antitripanossomatídeos inibidores da DHFR: pirimetamina e sulfadiazina.

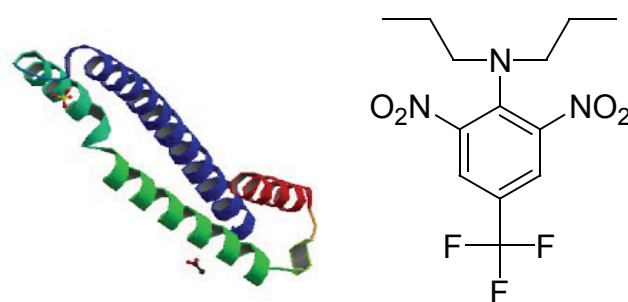
Zucotto e colaboradores descreveram a modelagem molecular da enzima DHFR de *T. cruzi* com base na estrutura cristalográfica da enzima DHFR de *L. major*. Vários derivados do metotrexato, um inibidor da correspondente enzima humana, foram sintetizados e ensaiados, e alguns desses novos derivados mostraram uma maior seletividade pela enzima DHFR do parasito do que pela enzima homóloga dos humanos.<sup>42</sup>

## ENZIMAS DA BIOSÍNTESE DE MICROTÚBULOS

Os tripanossomatídeos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* exibem uma forma celular particular que é definida por seus citoesqueletos internos. O citoesqueleto é caracterizado por um subpeculiar coleto de microtúbulos que são ligados em cruz reciprocamente, e na membrana plasmática, conferindo uma organização precisa de suas organelas.<sup>43</sup> A tubulina é um dos vários membros de uma pequena família de proteínas globulares. Os membros mais usuais da família da tubulina são o  $\alpha$ -tubulina e o  $\beta$ -tubulina, que são as proteínas que compõem os microtúbulos. Cada uma delas tem um peso molecular de aproximadamente 55 kDa. Os microtúbulos são formados por dímeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -tubulina.<sup>44</sup>

A diferença estrutural entre as tubulinas de parasitos e mamíferos é de aproximadamente 18%, destacando que estas enzimas são bastante abundantes em tripanossomatídeos. Já a  $\gamma$ -tubulina apresenta um importante papel na regulação da nucleação de microtúbulos e funcionamento dos flagelos, indicando-a como possível alvo molecular.<sup>45 e 46</sup>

Inibidores de microtúbulos são comercializados desde 1960, sendo a trifluralina e seus análogos, compostos que têm apresentado resultados satisfatórios na inibição da síntese de tubulinas em tripanossomatídeos (**Figura 11**)<sup>46 e 47</sup>. No entanto, a trifluralina apresenta atividade carcinogênica, o que tem limitado avanços e desenvolvimento de análogos.<sup>48</sup>



**Figura 11.**  $\alpha$ -Tubulina humana (<http://www.pdb.org/pdb/home/home>) e estrutura da trifluralina.<sup>49</sup>

## DNA TOPOISOMERASES

As DNA topoisomerasas (**Figura 12**) são enzimas que catalisam mudanças na topologia da molécula de DNA, alterando o número de vezes que as fitas do DNA se entrelaçam entre si e no espaço. A isomerização topológica do DNA ocorre através da quebra transitória de uma ou ambas as fitas da molécula. Assim, a partir desta diferença, surgem respectivamente duas categorias de topoisomerasas: as do tipo I e as do tipo II.<sup>50</sup>

As topoisomerasas do tipo I (topo I), no curso da reação clivam apenas uma das fitas do DNA, enquanto as topoisomerasas do tipo II (topo II) clivam ambas as fitas de DNA.<sup>50, 51</sup>

Os tripanossomatídeos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* apresentam um único flagelo com uma complexa estrutura paraxial, microtúbulos subpelculares associados à membrana plasmática e uma única mitocôndria contendo uma região alargada



com acúmulo de DNA denominada cinetoplasto.<sup>52</sup> O cinetoplasto concentra, aproximadamente, 30% do DNA dos tripanossomatídeos, sendo formado por dois tipos de moléculas: os minicírculos (com tamanho variando entre 0,5 e 2,5 Kb) e os maxicírculos (com tamanhos variando entre 20 e 38 Kb). Aproximadamente, dez mil minicírculos e cinquenta maxicírculos se encontram formando uma extensa rede de kDNA, como é chamado o DNA do cinetoplasto.<sup>53</sup> Os minicírculos de uma determinada espécie são altamente heterogêneos quanto à sequência de nucleotídeos, embora o tamanho destes círculos dentro da rede de kDNA seja idêntico.<sup>50</sup> Ainda segundo Shapiro, apesar da grande heterogeneidade, os minicírculos dos tripanossomatídeos apresentam pelo menos uma região conservada, que corresponde à origem de replicação.<sup>54</sup>

A replicação do kDNA é um processo complexo e restrito à fase S do ciclo celular.<sup>55</sup> Neste processo, os minicírculos covalentemente ligados são decatados e liberados da região central da rede de kDNA. Uma vez livres, os minicírculos migram para um dos dois complexos protéicos situados em pólos opostos da periferia do cinetoplasto onde há as enzimas necessárias para a replicação do kDNA.<sup>54</sup>

Nos tripanossomatídeos as topoisomerases apresentam uma importante função na replicação do DNA do cinetoplasto, já que atuam na liberação dos minicírculos da rede de kDNA para que estes se repliquem como moléculas livres, catalisam a segregação de novos minicírculos sintetizados e religam os mesmos à rede de DNA. Além da atividade catalítica, a topo II desempenha um papel estrutural de ancoragem dos maxicírculos à membrana mitocondrial e na mediação da movimentação dos maxicírculos durante a replicação.<sup>56</sup>

Assim, o DNA do cinetoplasto dos tripanossomatídeos tem gerado grande interesse no meio científico como um alvo quimioterápico. A DNA topoisomerase I (Figura 9), recentemente isolada de *L. donovani*, está envolvida no relaxamento de rede do DNA do cinetoplasto e, possivelmente, em sua replicação. Já os inibidores das DNA topoisomerases II demonstraram atividade contra parasitos (amastigotas e promastigotas) de *L. aethiopica*, *L. mexicana* e *L. major*.<sup>57, 58</sup>

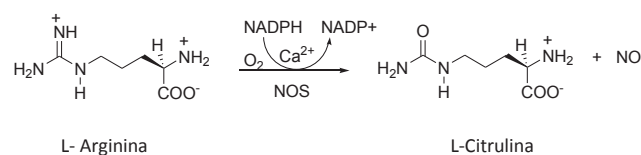


**Figura 12.** Estrutura cristalográfica do heterodimérico topoisomerase I-vanadato de *L. donovani* em complexo com DNA59 (<http://www.pdb.org/pdb/home/home>).

## ÓXIDO NÍTRICO SINTASE

A óxido nítrico sintase NOS, (**Figura 13**), assim como a arginase, utiliza a L-arginina como substrato, produzindo citrulina e óxido nítrico. A NOS é expressa em macrófagos e essa produção é uma importante resposta microbicida dessas células.<sup>60</sup> A NOS é dependente de L-arginina, possibilitando a atuação negativa da arginase na regulação do nível de NO produzido, consumindo o substrato na NOS.<sup>61</sup>

Foi demonstrado que a presença de um inibidor de arginase, a N-hidróxi-L-arginina, diminui a capacidade de *L. major* em estabelecer a infecção em macrófagos.<sup>62</sup>

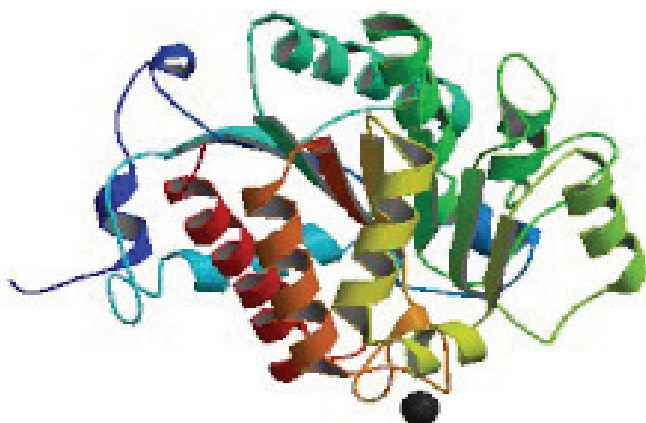


**Figura 13.** Óxido nítrico sintase (NOS)<sup>63</sup> e conversão da arginina a citrulina<sup>7</sup>.

## ARGINASE

A arginase (Figura 14) é uma metaloenzima com um centro binuclear de magnésio que catalisa a hidrólise de L-arginina para L-ornitina e ureia, na etapa final do ciclo da ureia. Tal ciclo representa uma série de reações bioquímicas que permite aos mamíferos eliminar ureia que é prejudicial ao organismo.<sup>64</sup>

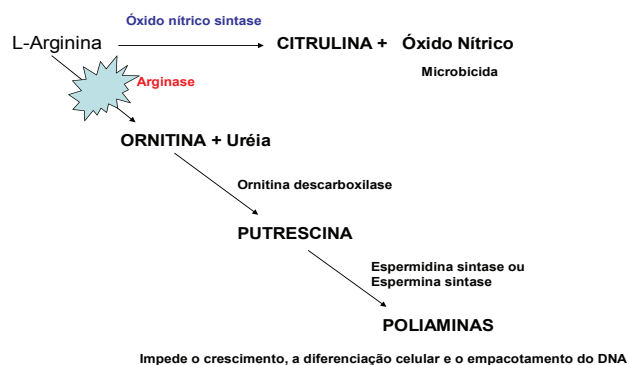
Existem duas isoenzimas da arginase. A arginase I é encontrada principalmente no citoplasma e participa do ciclo da ureia. Já a arginase II está envolvida na regulação dos níveis de concentração de arginina/ornitina em todas as células (ciclo da ureia), e está localizada nas mitocôndrias de todos os tecidos do corpo com maior abundância nos rins e próstata e pode ser encontrada em baixos níveis no cérebro, nas glândulas mamárias e nos macrófagos.<sup>65,66</sup>



**Figura 14.** Estrutura da arginase de *Trypanosoma cruzi*<sup>67</sup> (<http://www.pdb.org/pdb/home/home>).

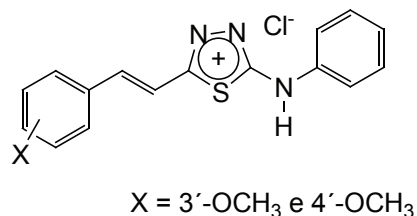
A arginase, conforme citado anteriormente, pode atuar negativamente na regulação dos níveis de NO produzidos pela NOS consumindo o substrato arginina, logo diminuindo a eficiência da produção de óxido nítrico pelo macrófago e, desta forma, impedindo uma melhor resposta microbicida natural. Indiretamente, a inibição da arginase acarreta no impedimento da produção de ornitina e, conseqüentemente, afeta a biossíntese de poliaminas (Figura 15).<sup>63</sup>

### Esquema de Competição entre Óxido nítrico sintase e Arginase



**Figura 15.** Esquema de competição pela L-arginina entre as enzimas NOS e arginase.

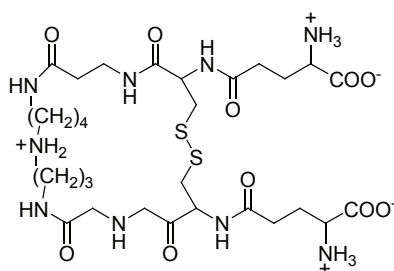
Ensaio realizados em culturas de *L. amazonensis* com as formas promastigotas e amastigotas axênicas, reportados por Bezerra-Soares e colaboradores, frente a compostos mesoiônicos da classe 1,3,4-tiadiazólio-2-aminadas, revelaram uma significativa diminuição na produção de óxido nítrico para os derivados metoxilados nas posições 3' ou 4' (cloreto de 4-fenil-5-[4' ou 3'-metoxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina, Figura 16), indicando o efeito de inibição da atividade da arginase.<sup>68</sup>



**Figura 16.** Estrutura do cloreto de 4-fenil-5-[3' ou 4'-metoxicinamoil]-1,3,4-tiadiazólio-2-fenilamina.

## TRIPANOTIONA REDUTASE

A tripanotiona redutase (Figura 17) pertence à família das FAD dissulfeto oxireductases, que compreende (em mamíferos), além da glutathione redutase, a lipoamida desidrogenase e a tioredoxina redutase.<sup>10</sup> Esta enzima mantém a tripanotiona em sua forma reduzida e assim capaz de ser oxidada para tripanotiona oxidase, levando a redução dos níveis de radicais livres e contribuindo para a manutenção de um ambiente intracelular redutor.<sup>25</sup>



Tripanotiona

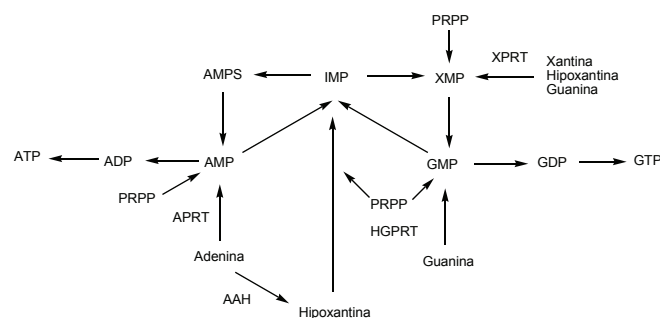
**Figura 17.** Tripanotiona redutase não-ligada de *Crithidia fasciculata*,<sup>69</sup> e estrutura de seu substrato a tripanotiona.

Em tripanossomatídeos a tripanotiona redutase representa o principal mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo. No hospedeiro humano o mecanismo enzimático defensivo contra o estresse oxidativo é realizado pela glutatona, catalase e superóxido desmutase.<sup>70</sup> Em humanos ainda existe um mecanismo não enzimático de defesa, envolvendo moléculas anti-oxidantes tais como o  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -tocoferol, o que é inexistente nos tripanossomatídeos.<sup>71</sup> Pita e Pascutti relatam que entre as enzimas homólogas, tripanotiona redutase do parasito e glutadiona redutase do hospedeiro humano, existe uma significativa semelhança entre os aminoácidos relacionados à ligação com a glutatona na glutatona redutase e aqueles aminoácidos correspondentes relacionados à ligação da tripanotiona com a tripanotiona redutase. Este fato, deveria representar um entrave ao planejamento de novos fármacos, já que os alvos, por apresentarem tamanha semelhanças, não propiciariam seletividade.<sup>72</sup> No entanto, a análise da superfície de potencial eletrostático dos sítios ativos das enzimas revela que o sítio ativo da glutatona redutase é mais carregado positivamente e hidrofílico. De outro modo, o sítio ativo da tripanotiona redutase é mais espaçoso, garantindo assim, diferenças quanto à especificidade e seletividade entre as enzimas.<sup>73</sup>

Assim, Macarri e colaboradores consideram a tripanotiona redutase como um dos principais alvos enzimáticos para o desenho de fármacos, cujo objetivo é o tratamento da doença de Chagas.<sup>73</sup>

## HIPOXANTINA-GUANINA FOSFORIBOSILTRANSFERASE

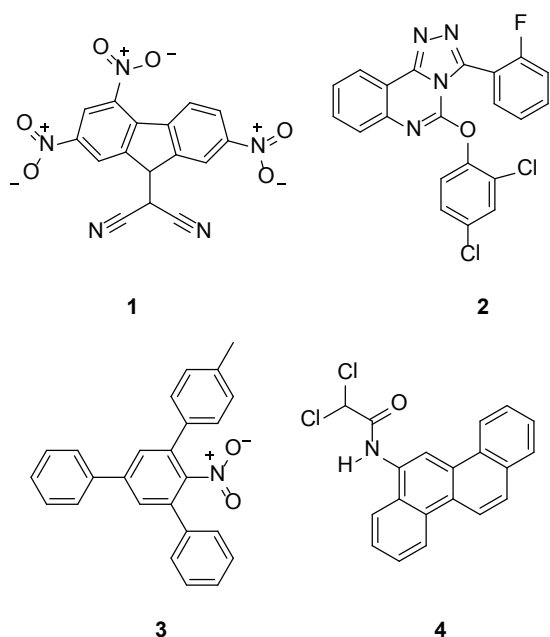
As purinas são essenciais para a síntese de nucleotídeos, porém, os tripanossomatídeos, diferentemente dos hospedeiros vertebrados, são auxotróficos para purino-nucleotídeos, isto é, não apresentam a via de síntese de novo desta base, convertendo bases de purina a ribonucleotídeos através de uma única enzima a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) (**Figura 18**). Sendo assim, os tripanossomatídeos são totalmente dependentes desta enzima para recuperação das purinas durante seu ciclo de vida.<sup>74</sup>



AMP, GMP, IMP: nucleotídeos monofosfatados; XPRT: xantina-fosforibosiltransferase; APRT: adenina-fosforibosiltransferase; ADP e GDP: nucleotídeos difosfatados; PRPP: 5-fosforibosil-1-pirofosfato; AAH: adenina aminidrolase; HGPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase.

**Figura 18.** Via de recuperação de purinas por protozoários do gênero *Trypanosoma* adaptado de Silva e colaboradores.<sup>75</sup>

Estudos de modelagem molecular conduzidos por Freymann e colaboradores identificaram vinte e duas estruturas como potenciais inibidores para a enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase.<sup>74</sup> Ensaios revelaram que três desses compostos foram eficazes contra a forma amastigota intracelular de *T. cruzi*, enquanto que o derivado [6-(2,2-dicloro)-acetamido]-criseno (4) apresentou-se como um potente inibidor da HGPRT (**Figura 19**).



**Figura 19.** Estruturas identificadas por Freymann e colaboradores como ativos frente à forma amastigota intracelular de *T. cruzi* (1-3) e inibidor da enzima hipoxantina-guanina fosforiltransferase (4).

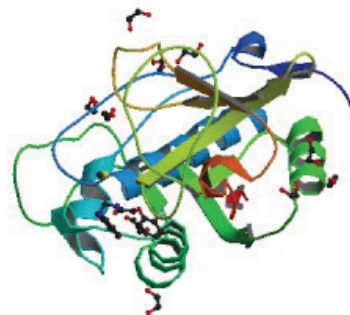
## CISTEÍNA PROTEASE

Nos protozoários da família Trypanosomatidae, as enzimas cisteína-proteases são muito distribuídas, já tendo sido detectadas em vários gêneros como: *Crithidia*, *Phytomonas*, *Herpetomonas*, *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum*. Neste grupo de micro-organismos, estas enzimas estão envolvidas na nutrição, ciclo de vida e na diferenciação morfológica destes parasitos.<sup>76</sup>

Testes preliminares mostraram que a utilização de inibidores destas proteases é capaz de bloquear a transmissão do parasito. Relato recente na literatura indica que a inibição de cisteína-proteases se apresenta como uma importante estratégia para o tratamento de doenças parasitárias como a doença do sono, doença de Chagas e leishmanioses.<sup>77</sup>

No *T. cruzi* a cisteína-protease, chamada especificamente de cruzaina (**Figura 20**), apresenta importante papel no ciclo de desenvolvimento do parasito e está envolvida na penetração do parasita dentro das células hospedeiras, participa da nutrição do parasita à custa do hospedeiro e dos mecanismos de escape do parasita contra o sistema imune do hospedeiro.<sup>78</sup>

Em parasitos do gênero *Leishmania*, inibidores de cisteína-proteases impedem em grande parte a transformação de promastigotas para amastigotas, e diminuem dramaticamente a infecção de macrófagos.<sup>79</sup>



**Figura 20.** O complexo cruzaina com ligante não covalente<sup>80</sup> (<http://www.pdb.org/pdb/home/home>).

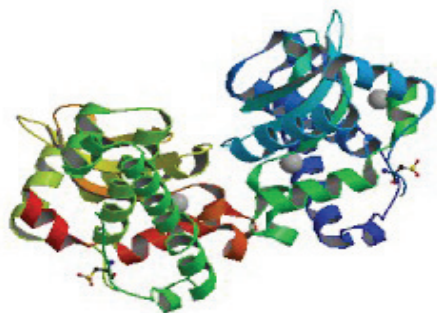
## SUPERÓXIDO DISMUTASE

A enzima superóxido dismutase (**Figura 21**), catalisa a transformação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, através de reações alternadas de redução e de oxidação do metal do sítio ativo na metaloenzima.<sup>81</sup> Assim, a inibição desta enzima provoca um estresse oxidativo no parasito pelo acúmulo do íon superóxido. Segundo Turrens e colaboradores, parasitos do gênero *Trypanosoma* apresentam sistemas antioxidantes deficientes em comparação com mamíferos, o que representa um importante diferencial para o desenvolvimento de novos fármacos específicos na inibição dessa enzima.<sup>82</sup>

As enzimas superóxido dismutase são classificadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo. O protozoário *T. cruzi* possui a enzima superóxido dismutase contendo um átomo de ferro em seu sítio ativo, ausente em células de eucariotos, o que explica o interesse sobre fármacos que atuam sobre esta enzima no parasito.<sup>83</sup>

O mecanismo de ação dos compostos metálicos de ferro sobre a inibição da enzima superóxido dismutase, cuja atividade e importância aumentam em parasitos infectantes, levaria a um aumento do nível de radicais superóxido e a consequente morte do parasito.<sup>84</sup>

Além disso, sabe-se que peróxido de hidrogênio formado no meio intracelular é removido em células de mamíferos por ação da catalase e de outras peroxidases. No entanto, em tripanossomatídeos que não dispõem ou dispõem de baixas concentrações de catalase e glutathione peroxidase isto não ocorre provocando um acúmulo de peróxido de hidrogênio que provoca o colapso oxidativo nesses tripanossomatídeos, levando-os à morte.<sup>85-87</sup>



**Figura 21.** Estrutura cristalina da enzima Fe-superóxido dismutase de *Trypanosoma cruzi*<sup>88</sup> (<http://www.pdb.org/pdb/home/home>).

### 3. CONCLUSÕES

A presente revisão indica que trabalhos recentes revelam a possibilidade de se identificar inibidores seletivos de enzimas importantes envolvidas em tripanossomatídeos como alvos quimioterápicos.

Conclui-se que as enzimas-alvo pertencem a várias rotas energéticas, metabólicas ou biossintéticas, que a via metabólica das poliaminas vêm despertando grande interesse científico pelas diferenças comprovadas entre os metabolismos de parasitos e do hospedeiro humano.

A inibição da arginase, recentemente, revela-se, também, bastante promissora, pois esta enzima atua simultaneamente, competindo com a NOS e interferindo na biossíntese de poliaminas, o que em ambas as situações causam uma elevada diminuição do nível de vida dos tripanossomatídeos.

Além disso, esses micro-organismos, evolutivamente, se adaptaram a determinadas condições e desenvolveram muitas maneiras de escape, estabelecendo uma condição de promiscuidade enzimática, isto é, uma condição especial onde determinada enzima altera sua especificidade e possivelmente estabelece novas rotas que ainda são desconhecidas pela ciência. Assim, acreditamos que o efeito sinér-

gico entre vários fármacos com alvos em sistemas biológicos diferentes possa ser uma saída para esse enigma que se coloca.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Tracy, J. W.; Webster J. R. Em *Chemotherapy of parasitic infections*; Hardman, J. G.; Limbird, L. E.; Gilman, A. G., eds.; Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10th ed. McGraw Hill: New York, 2001, p. 1059-1069.
- <sup>2</sup> World Health Organization 2007, Report on Chagas' disease, TDR special programme for research and training in tropical diseases, World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/report-enfermedad-chagas> Acesso em: 20 janeiro 2011.
- <sup>3</sup> Frayha, G. J.; Smyth, J. D.; Gobert, J. G.; Savel, J. *Gen. Pharmacol.*, 1997, 28, 273.
- <sup>4</sup> Veronesi, R. *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 8ª ed., 1991, p. 674-705 e 706-717.
- <sup>5</sup> Vickerman, K. Em *Comparative Cell Biology of the Kinetoplastid Flagellates*; W. H. R. Lumsden; D. A. Evans eds.; Biology of the Kinetoplastida, Academic Press: Londres, New York, San Francisco, 1976, p. 35-130.
- <sup>6</sup> Dias, L. C.; Desso, M. A.; Silva, J. J. N.; Thiemann, O. H.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D. *Quim. Nova* 2009, 32, 2444.
- <sup>7</sup> Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. Em *Principles of Biochemistry*; 4ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2005, p. 456.
- <sup>8</sup> Gil, E. S.; Cunha, L. C.; Paula, J. R.; Bezerra, J. C. B.; Aguiar, F. A. *Vita et Sanitas*, 2007, 1, 1.
- <sup>9</sup> Genestra, M.; Guedes-Silva, D.; Souza, W. J. S.; Cysne-Finkelshtein, L.; Soares-Bezerra, R. J.; Monteiro, F. P.; Leon, L. L. *Arch. Med. Res.* 2006, 37, 238.
- <sup>10</sup> Urbina, J. A. *Acta Trop.* 2010, 115, 55.
- <sup>11</sup> Verlinde, C. L. M. J.; Hannaert, V.; Blonski, C.; Willson, M.; Périé, J. J.; Fothergill-Gilmore, L. A.;

- Oppendoes, F. R.; Gelb, M. H.; Hol, W. G. J.; Michels, P. A. *Drug Resist Update* 2001, 4, 50.
- <sup>12</sup> Oppendoes, F. R. *Brit. Med. Bull.* 1985, 41, 130.
- <sup>13</sup> Oppendoes, F. R. *Annu. Rev. Microbiol.* 1987, 41, 127. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>14</sup> Engel, J. C.; Cazzulo, B. M. F.; Stoppani, A. O. M.; Cannata, J. J. B.; Cazzulo, J. J. *Mol. Biochem. Parasit.* 1987, 26, 1.
- <sup>15</sup> Barret, M. P.; Coombs, G. H.; Motram, J.C. *Trends Microbiol.* 1999, 7, 82.
- <sup>16</sup> Moyersoer, J.; Choe, J.; Fan, E.; Hol, W. J. M. G. J.; Michels, P. A. M. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004, 28, 603.
- <sup>17</sup> Suresh, S.; Bressi, J.C.; Kennedy, K.J.; Verlinde, C.L.; Gelb, M.H.; Hol, W.G. J. *Mol. Biol.* 2001, 309, 423.
- <sup>18</sup> Nyasse, B.; Nono, J.; Sonke, B.; Denier, C.; Fontaine, C. *Pharmazie* 2004, 59, 492.
- <sup>19</sup> Cordeiro, A. T.; Feliciano, P. R.; Nonato, M. C. *Acta Crystallogr. Section F* 2006, 62, 1049.
- <sup>20</sup> Dax, C.; Duffieux, F.; Chabot, N.; Coincon, M.; Sygusch, J.; Michels, P. A. M.; Blonski, P. A. M. J. *Med. Chem.* 2006, 49, 14499.
- <sup>21</sup> Illana, V. O.; Montfort, R. P.; Calahorra, F. L. Costas, M.; Romero, A. R.; Puyou, M. T. G. *Biochemistry-US.* 2006, 45, 2556.
- <sup>22</sup> Smith, T. K.; Bütikofer, P. *Mol. Biochem. Parasit.* 2010, 172, 66.
- <sup>23</sup> Brun, R.; Buhler, Y.; Sanmaier, U.; Kaminsky, R.; Bachi, C. J.; Rattendi, D.; Lane, S.; Croft, S.; Snowden, D.; Yardley, V.; Caravatti, G.; Frei, J.; Stanek, J.; Mett, H. *Antimicrob. Agents Ch.* 1996, 40, 1442.
- <sup>24</sup> Fairmamb, A. H.; Cerami, A. *Mol. Biochem. Parasit.* 1985, 2, 187.
- <sup>25</sup> Heby, O.; Persson, L.; Rentala, M. *Amino Acids* 2007, 33, 359.
- <sup>26</sup> Lepesheva, G. I.; Hargrove, T. Y.; Anderson, S.; Kleshchenko, Y.; Furtak, V.; Wawrzak, Z.; Villalta, E.; Waterman, M. *Chem. Biol.* 2007, 14, 1283.
- <sup>27</sup> Urbina, J. A.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2009, 104, 311.
- <sup>28</sup> Zacchino, A. S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. Em: Yunes, R. A.; Calixto, J. B.; Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Argos, 2001. p. 436-473.
- <sup>29</sup> Pena-Diaz, J.; Montalvetti, A.; Flores, C. L.; Constantan, A.; Hurtado-Guerrero, R.; De S. W.; Gancedo, C.; Ruiz-Perez, L. M.; González-Pacanowska, D. *Mol. Biol. Cell.* 2004, 15, 1356.
- <sup>30</sup> Beach, D. H. Goad, L. J.; Holz, G. G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, 136, 851.
- <sup>31</sup> Hurtado-Guerrero R.; Pena-Diaz, J.; Montalvetti, A.; Ruiz-Perez, L.M.; González-Pacanowska, D. *FEBS Lett.* 2002, 510, 141.
- <sup>32</sup> Braga, M. V.; Urbina, J. A.; de Souza, W. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2004, 24, 72.
- <sup>33</sup> Lazard, K.; Urbina, J. A.; De Souza, W. *Antimicrob. Agents Ch.* 1990, 34, 2097.
- <sup>34</sup> Buckner, F. S.; Urbina, J. A. *Inter. J. Parasitol.: Drugs and Drug Resistance* 2012, in press.
- <sup>35</sup> Rodrigues, J. C. F.; Attias, M.; Rodrigues, C.; Urbina, J.; de Souza, W. *Antimicrob. Agents Ch.* 2002, 46, 487.
- <sup>36</sup> Magaraci, F.; Jimenez, C. J.; Rodrigues, C.; Rodrigues, J. C. F.; Braga, M. V.; Yardley, V.; Luca-Fradley, K.; Croft, S. L.; de Souza, W.; Ruiz-Perez, L.; Urbina, J.; Pacanowska, D.; Gilbert, I. H. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 4714.
- <sup>37</sup> Lorente, S. O.; Jimenez, C. J.; Gros, L.; Vanessa Yardley, V.; Luca-Fradley, K.; Croft, S. L.; Urbina, J. A.; Ruiz-Perez, L. M.; Dolores Gonzalez Pacanowskab, D. G.; Gilbert, I. H. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 5435.

- <sup>38</sup> Soares-Bezerra, R. J.; Leon L.; Genestra M. Braz. J. Pharm. Sci. 2004, 40, 140.
- <sup>39</sup> Senkovich, O.; Schomann, N.; Chattopadhyay, D. Disponível em: <<http://www.pdb.org/pdb/home/home>>. Acesso em: 20 de agosto 2011.
- <sup>40</sup> Lambie, D. G.; Johnson, R. H. Drugs. 1985, 30, 145.
- <sup>41</sup> Gangjee, A.; Jain, H. D.; Kurup, S. Anticancer Agents Med. Chem. 2007, 7, 524.
- <sup>42</sup> Zucotto, F.; Brun, R.; Pacanowska, G. D.; Perez, L. M. R.; Gilbert, I. H. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1999, 9, 1463.
- <sup>43</sup> Gull, K. Annu. Rev. Microbiol. 1999, 53, 629.
- <sup>44</sup> Downing, K. H.; Nogales, E. Curr. Opin. Struct. Biol. 1998, 8, 785.
- <sup>45</sup> Armson, A.; Kamau, S. W.; Grimm, F.; Reynoldson, J. A.; Best, W. N.; Macdonald, L. M.; Thompson, R. C. A. Acta Trop. 1999, 73, 303.
- <sup>46</sup> Libusová, L.; Sulimenko, T.; Sulimenko, V.; Hozák, O.; Draber, P. Exp. Cell Res. 2004, 295, 375.
- <sup>47</sup> Callahan, H. L.; Kelley, C.; Perreira, T.; Grogl, M. Antimicrob. Agents Ch. 1996, 40, 947.
- <sup>48</sup> Werbovets, K. A.; Brendle, J. J.; Sackett, D. L. Mol. Biochem. Parasit. 1999, 98, 53.
- <sup>49</sup> Guasch, A.; Aloria, K.; Perez, R.; Avila, J.; Zabala J. C.; Coll, M. J. Mol. Biol. 2002, 318, 1139.
- <sup>50</sup> Wang, J. C. Annu. Rev. Biochem. 1996, 65, 523.
- <sup>51</sup> Champoux, J. J. Annu. Rev. Biochem. 2001, 70, 369.
- <sup>52</sup> De Souza, W.; Notta, M. C. FEMS Microbiol. Lett. 1999, 173, 1.
- <sup>53</sup> Simpson, L.; Thiemann, O. H.; Savill, N. J.; Alfonso, J. D.; Maslov, D. A. Proc. Nati. Acad. Sci. USA 2000, 97, 6986.
- <sup>54</sup> Shapiro, T. A.; Englund, P. T. Annu. Rev. Microbiol. 1995, 49, 117.
- <sup>55</sup> Hines, J. C.; Ray, D. S. Mol. Biochem. Parasit. 1997, 88, 249.
- <sup>56</sup> Shapiro, T. A.; Showalter, A. F. Mol. Cell. Biol. 1994, 14, 5891.
- <sup>57</sup> Slunt, K. M.; Grace, J. M.; Macdonald, T. L.; Pearson, R. D. Antimicrob. Agents Ch. 1996, 40, 706.
- <sup>58</sup> Mael, J.; Denny, W.; Gamage, S.; Ransijn, A.; Wojcik, S.; Figgitt, D.; Ralph, R. Antimicrob. Agents Ch. 1993, 37, 991.
- <sup>59</sup> Davies, D. R.; Mushtaq, A.; Interthal, H.; Champoux, J. J.; Hol, W. G. J. Mol. Biol. 2006, 357, 1202.
- <sup>60</sup> Mori, M.; T. Gotoh, Biochem. Biophys. Res. 2000, 275, 715.
- <sup>61</sup> Boucher, J. L.; Moali, C.; Tenu, J. P. Cell. Mol. Life Sci. 1999, 55, 1015.
- <sup>62</sup> Iniesta, V.; Gomez-Nieto, L. C.; Corraliza, I. J. Exp. Med. 2001, 6, 777.
- <sup>63</sup> Shimizu, H.; Park, S. Y.; Shiro, Y.; Adachi, S. Acta Crystallogr. Sect. D. 2002, 58, 81.
- <sup>64</sup> da Silva, E. R.; da Silva, M. F. L.; Fischer, H.; Mortara, R. A.; Mayer, M. G.; Framesqui, K.; Silber, A. M.; Floeter-Winter, L. M. Mol. Biochem. Parasit. 2008, 159, 104.
- <sup>65</sup> Di Costanzo, L.; Moulin, M.; Haertlein, M.; Meilleur, F.; Christianson, D. W. Arch. Biochem. Biophys. 2007, 465, 82.
- <sup>66</sup> Morris, S. M. Annu. Rev. Nutr. 2002, 22, 87.
- <sup>67</sup> Arakaki, T. L.; Merrit, E. A. Disponível em: <<http://www.pdb.org/pdb/home/home>>. Acesso em: 20 de agosto 2011.
- <sup>68</sup> Soares-Bezerra, R. J.; da Silva, E. F.; Echevarria, A.; da Silva, L. G.; Cysne-Finkelstein, L.; Monteiro, F. P.; Leon, L. L. Genestra, M. J. Enzym. Inhib. Med. Chem. 2008, 23, 328.
- <sup>69</sup> Bailey, S.; Fairlamb, A. H.; Hunter, W. N. Acta Crystallogr. Sect. D. 1994, 50, 139.

- <sup>70</sup> Bonnefoy, M.; Draï, J.; Kostka, T. *Presse Medicale*, 2002, 31, 1174.
- <sup>71</sup> Gutteridge, J. M.; Halliwell, B. *Ann. New York Acad. Sci.* 2000, 899, 136.
- <sup>72</sup> Pita, S. S. da R.; Pacutti, P. G. *Rev. Virtual Quim.* 2011, 3, 307.
- <sup>73</sup> Maccari, G.; Jaeger, Timo; Moraca, F.; Biava, M.; Flohé, L.; Botta, M. *Biorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 5255.
- <sup>74</sup> Freymann, D. M.; Wenck, M. A.; Engel, J. C.; Feng, J.; Focia, P. J.; Eakin, A. E.; Craig, S. P. *Chem. Biol.* 2000, 7, 957.
- <sup>75</sup> Silva, M.; Silva, C. H. T. P.; Iulek, J.; Oliva, G.; Thiemann, O. H. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1696, 31.
- <sup>76</sup> Bocedi, A.; Gradoni, L.; Menegatti, E.; Ascenzi, P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 315, 710.
- <sup>77</sup> Chai, Y.; Yan, S.; Wong, I. L. K.; Chow, L. M. C.; Sun, H. J. *Inorg. Biochem.* 2005, 99, 2257.
- <sup>78</sup> Steert, K.; Berg, M.; Mottram, J. C.; Westrop, G. D.; Coombs, G. H.; Cos, P.; Maes, L.; Joossens, J.; Van Der Veken, P.; Haemers, A.; Augustyns, K. *Chem. Med. Chem.* 2010, 53, 1734.
- <sup>79</sup> Silva-Jardim, I.; Horta, M. F.; Ramalho-Pinto, F. J. *Acta Trop.* 2004, 91, 121.
- <sup>80</sup> Ferreira, R. S.; Simeonov, A.; Jadhav, A.; Eidam, O.; Mott, B. T.; Bryan, T. M.; Keiser, M. J.; Mckerrrow, J. H.; Maloney, D. J.; Irwin, J. J.; Shoichet, B. K. *J. Med.Chem.* 2010, 53, 4891.
- <sup>81</sup> Ludwig, M. L. Metzger, A. L.; Pattridge, K. A.; Stallings, W. C. *J. Mol. Biol.* 1991, 219, 335.
- <sup>82</sup> Turrens, J. F. *Mol. Aspects Med.* 2004, 25, 211.
- <sup>83</sup> Le Trant, N.; Meshnick, D. R.; Kitchener, K.; Eaton, J. W.; Cerami, A. *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 125.
- <sup>84</sup> Raychaudrury, B.; Banerjee, S.; Gupta, S.; Singh, R.V.; Datta, S. C. *Acta Trop.* 2005, 95, 1.
- <sup>85</sup> Leid, R. W.; Suquet, C. M.; Tanigoshi, L. *Acta Leidensia* 1989, 57, 107.
- <sup>86</sup> DoCampo, R.; Moreno, S. N. *Fed. Proc.* 1986, 45, 2471.
- <sup>87</sup> Flohe, L.; Jaeger, T.; Pilawa, S.; Sztajer, H. *Redox Rep.* 2003, 8, 256.
- <sup>88</sup> Bachega, J. F.; Navarro, M. V.; Bleicher, L., Bortoletto-Bugs, R. K.; Dive, D., Hoffmann, P.; Viscogliosi, E.; Garratt, R.C. *Proteins* 2009, 77, 26.