UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização bioquímica, biofísica e estudos inibitórios da
enzima diidroorotato desidrogenase de *Schistosoma mansoni***

Juliana Serafim David Costacurta

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização bioquímica, biofísica e estudos inibitórios da
enzima diidroorotato desidrogenase de *Schistosoma mansoni***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientada: Juliana Serafim David
Costacurta

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Cristina
Nonato Costa

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 26/09/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

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.

Costacurta, Juliana Serafim David

Caracterização bioquímica, biofísica e estudos inibitórios da enzima diidroorotato desidrogenase de *Schistosoma mansoni*.
Ribeirão Preto, 2014.

79 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: Costa, Maria Cristina Nonato.

1. Diidroorotato desidrogenase. 2. Doenças negligenciadas.
3. Estudos enzimáticos inibitórios.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Serafim David Costacurta

Caracterização bioquímica, biofísica e estudos inibitórios da enzima diidroorotato desidrogenase de *Schistosoma mansoni*

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina
Nonato Costa

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico esta dissertação aos meus pais, Roberto e Adriana,
ao meu marido, Ricardo, à minha filha, Beatriz,
e em especial ao meu avô Munir, grande exemplo de homem,
ao qual vou sempre me espelhar!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, pelas inúmeras oportunidades que me concedeu, pela confiança e pelo exemplo de profissional que é.

Ao meu time, LCP, pelas idéias e incansáveis discussões. Sem o apoio de vocês este projeto não se realizaria! Joane, Paty, Valéria, Diego, Ricardo Soares, Guilherme e Vinícius, obrigada! Em especial quero agradecer à Renata, Ricardo de Pádua, Iara e Giovani. Muito obrigado pela força!

Aos Profs. Dr. Antonio Jose da Costa Filho, Dr. Flávio da Silva Emery, Dra. Eliane Candiani Arantes Braga e Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, por disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos para a execução deste projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, aonde tive a oportunidade de me formar como farmacêutica com excelência, de trabalhar como técnica de laboratório e de realizar meu mestrado.

Aos meus pais, que tanto me apoiaram para que eu pudesse sempre seguir com meus sonhos e objetivos.

Aos meus irmãos, parentes e amigos, que sempre estiveram ao meu lado: Marina, Leonardo, Gabi, Nat, Rose, Luzia, Cida, Andréia, Aline, Alyne, Bárbara, Nina, dentre muitos outros!

Ao meu marido e filha, meus amores e minha inspiração.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação
e persistência em se chegar a um objetivo.
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence
obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

José de Alencar

RESUMO

COSTACURTA, J. S. D. **Caracterização bioquímica, biofísica e estudos inibitórios da enzima diidroorotato desidrogenase de *Schistosoma mansoni***. 2014. 79f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Muitas doenças parasitárias, consideradas negligenciadas devido à falta de investimentos para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento por parte dos setores público e privado, constituem um grave problema de saúde pública mundial e um obstáculo ao desenvolvimento sócio-econômico de países pobres e emergentes. A esquistossomose, em especial, é uma parasitose causada por platelmintos trematódeos do gênero *Schistosoma* que afeta 78 países e aproximadamente 249 milhões de pessoas. No Brasil, o *S. mansoni* é o agente etiológico causador da esquistossomose, chega a atingir 19 estados e aproximadamente 6 milhões de indivíduos. Embora atualmente o fármaco praziquantel seja utilizado para o tratamento da esquistossomose, há a necessidade de busca por novas opções terapêuticas, uma vez que este possui eficácia restrita ao estágio adulto do parasita, efeitos colaterais que dificultam a adesão do paciente ao tratamento e, dada a massiva administração do medicamento, a resistência do parasita ao medicamento pode se tornar um sério problema de saúde pública. Dentro deste contexto, existe um grande interesse em buscar novos alvos macromoleculares e em particular investigar o potencial da enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) como possível alvo terapêutico para o desenvolvimento de terapias eficazes e seguras para o tratamento da esquistossomose. A enzima DHODH participa da quarta etapa enzimática da via de biossíntese de nucleotídeos pirimidínicos, e estudos recentes demonstram que a inibição específica desta enzima compromete a produção de nucleotídeos, e consequentemente a proliferação celular. Na verdade a enzima DHODH já é alvo validado para o tratamento de doenças como o câncer, a artrite reumatoide e doenças parasitárias como a malária. Como primeira etapa para a avaliação do potencial terapêutico da enzima DHODH no tratamento da esquistossomose, este projeto propõe a caracterização bioquímica e biofísica da DHODH de *Schistosoma mansoni*, bem como a identificação de inibidores para esta enzima. Os resultados obtidos até o presente momento consistem no desenvolvimento de um protocolo de expressão e purificação que permitiram a obtenção de proteína pura e com rendimento de 40 miligramas de proteína por litro de meio de cultura. Nossos estudos demonstraram que a proteína se mostra mais estável na presença de detergente, alta concentração de sal e glicerol. Ensaio de espalhamento dinâmico de luz realizados a partir de amostras de *SmDHODH* purificadas a partir da associação de cromatografia por afinidade com cromatografia por exclusão molecular foram utilizados para a caracterização de uma população homogênea de diâmetro aproximado de 90 Å. Ensaio de atividade enzimática e de inibição foram realizados para *SmDHODH*, como também para a proteína homóloga humana, *HsDHODH*, de forma a permitir estudos comparativos. Os resultados sugerem que o pH ótimo da reação para ambas as enzimas se encontra na faixa entre 8,0 e 8,5. O protocolo de caracterização cinética desenvolvido para estas enzimas permitiu a obtenção dos parâmetros K_M e k_{cat} , assim como dar início à realização de ensaios de inibição na presença de bancos de ligantes de origem sintética e natural. Os resultados cinéticos obtidos sugerem que a *SmDHODH* e a *HsDHODH* seguem o mecanismo

Ping-Pong, de acordo com o que já foi descrito para as outras DHODHs, com os seguintes valores de K_M e k_{cat} : $K_{DHO} = 174 \pm 18 \mu M$; $K_{QO} = 159 \pm 18 \mu M$; e $k_{cat} = 27 \pm 1 s^{-1}$ para a *SmDHODH* e $K_{DHO} = 286 \pm 31 \mu M$; $K_{QO} = 354 \pm 38 \mu M$; e $k_{cat} = 78 \pm 4 s^{-1}$ para a *HsDHODH*. Foram identificados compostos químicos com potencial inibitório na faixa de $794 \pm 3 \mu M$ a $19,1 \pm 0,1 nM$ para a *SmDHODH* e de $33,9 \pm 0,1 \mu M$ a $37,2 \pm 0,1 nM$ para a *HsDHODH*. Os resultados deste trabalho aliado aos estudos estruturais em desenvolvimento pelo nosso laboratório serão utilizados não só para a completa caracterização da enzima, mas também para o futuro planejamento de ligantes específicos baseados na estrutura e função protéica, como uma importante ferramenta no combate à esquistossomose.

Palavras-chave: esquistossomose; diidroorotato desidrogenase; caracterização bioquímica e biofísica; estudos inibitórios.

ABSTRACT

COSTACURTA, J. S. D. **Biochemical, biophysical and inhibitory studies of dihydroorotate dehydrogenase from *Schistosoma mansoni***. 2014. 79f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Many parasitic diseases, considered neglected due to lack of investment from the public and private sectors in the development of new strategies for prevention and treatment, are a serious global public health problem and a hindrance to the development of poor and emergent countries. Schistosomiasis, in particular, is a parasitic disease caused by trematode plathelminthes of the genus *Schistosoma* that affects 78 countries and approximately 249 million people. In Brazil, *S. mansoni*, the endemic etiologic agent of schistosomiasis, is found in 19 states and affects approximately 6 million people. Although the drug praziquantel is currently used for the treatment of schistosomiasis, this drug has limited effectiveness in the adult stage of the parasite, many side effects hamper the adherence to the patient's treatment and, given the intense drug usage, resistant parasites can, very soon, become a serious public health problem. Thus, there is a real need for the search of new therapeutic options. Within this context, there is a great interest in the search for new macromolecular targets against *Schistosoma mansoni* and in particular, to investigate the enzyme dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) as new therapeutic target for the treatment of schistosomiasis. DHODH catalyzes the conversion of dihydroorotate (DHO) to orotate (ORO) in the fourth step of the pyrimidine nucleotides pathway. Recent studies show that specific inhibition of this enzyme commits nucleotides biosynthesis and, consequently, cell proliferation. DHODH is, in fact, a validated target for the treatment of diseases such as cancer, rheumatoid arthritis and malaria. As a first step towards the evaluation of the therapeutic potential of DHODH from *S. mansoni* (*SmDHODH*) for the treatment of schistosomiasis, this project proposed the biochemical and biophysical characterization, as well as the identification of inhibitors for this enzyme. The results obtained so far included the development of an expression and purification protocol that allowed us to obtain pure protein with a good yield. In addition, our findings reveals that for *SmDHODH* stabilization the enzyme requires a buffer containing detergent, glycerol and high salt concentration. Dynamic light scattering studies performed with *SmDHODH* protein samples purified by a combination of both affinity chromatography and size exclusion chromatography allowed the characterization of a homogeneous population with approximately 90 Å diameter. In order to allow comparative studies, enzymatic and inhibitory assays were performed for *SmDHODH* as well as for the human homologous enzyme (*HsDHODH*). The results suggest that for both enzymes the optimum pH for the enzymatic reaction is found in the range of 8.0 and 8.5. The enzymatic assay developed for this class of enzymes allowed the characterization of the kinetic parameters K_M and k_{cat} for both enzymes, as well as the performance of inhibitory assays in the presence of synthetic and natural ligands. The inhibition tests allowed us the identification of chemical compounds that inhibit *SmDHODH* in the range of $794 \pm 3 \mu M$ to $19.1 \pm 0.1 nM$ and *HsDHODH* in the range of $33.9 \pm 0.1 \mu M$ a $37.2 \pm 0.1 nM$. The results of this work, together with structural studies currently in progress in our laboratory will be exploited for the complete characterization of the

enzyme, as well as for the development of specific inhibitors of *Sm*DHODH, as an important tool in the fight against schistosomiasis.

Keywords: schistosomiasis; dihydroorotate dehydrogenase; biochemical and biophysical characterization; inhibitory studies.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Áreas endêmicas e focais da esquistossomose *mansoni*. Fonte: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose/Secretaria da Vigilância em Saúde/MS – 2008. 2
- Figura 2. Distribuição das espécies do gênero *Schistosoma* pelo mundo. Fonte: Gryseels *et al.*, 2006 ^[14]. 2
- Figura 3. Ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Souza *et al.*, 2011^[16]. 3
- Figura 4. Estrutura dos fármacos praziquantel (esquerda) e oxamniquina (direita). 5
- Figura 5. Via da biossíntese *de novo* de nucleotídeos pirimidínicos. Figura adaptada de Nelson e Cox (2008)^[37]. 6
- Figura 6. Estruturas cristalográficas das enzimas *HsDHODH* (*Homo sapiens*, PDB ID 2WV8), *EcDHODH* (*Escherichia coli*, PDB ID 1F76) e *PfDHODH* (*Plasmodium falciparum*, PDB ID 3I68) sobrepostas. As hélices pertencentes ao domínio de ancoragem à membrana da região N-terminal das enzimas *HsDHODH*, *EcDHODH* e *PfDHODH* estão representadas pelas cores rosa, amarela e cinza, respectivamente. No centro das estruturas, em amarelo, está o cofator flavina mononucleotídeo (FMN). 7
- Figura 7. Estrutura cristalográfica da enzima *HsDHODH* (*Homo sapiens*, PDB ID 2WV8), evidenciando o motivo barril α/β , o FMN em amarelo, e o produto da reação, orotato, em verde. 8
- Figura 8. A. Reação de óxido-redução catalisada pela enzima DHODH. O hidrogênio H^* é transferido para FMN como um hidreto, e o hidrogênio H' é perdido como um próton. B. No caso das enzimas membros da classe 1A, como de *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*, fumarato é o agente oxidante, responsável pela oxidação do $FMNH_2$ a FMN. C. No caso da enzima humana e de *Schistosoma mansoni*, ubiquinona é o agente oxidante. Figura gentilmente cedida pela aluna Renata Almeida Garcia Reis, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. 9
- Figura 9. Alinhamento das enzimas *HsDHODH*, *SmdDHODH*, *SjDHODH*, *PfDHODH* e *EcDHODH*. O domínio de interação com a membrana característico da classe 2 está próximo à região N-terminal (hélices α_1 e α_2). O resíduo de serina catalítico conservado nestas espécies está representado em azul. A sequência correspondente ao peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria predito para *HsDHODH* está representada com um traço laranja, e a sequência correspondente à hélice transmembrana predita para *HsDHODH* está representada com um traço verde (resíduos 12 a 29) ^[47]. 10
- Figura 10. Ilustração da construção das proteínas *SmdDHODH* e *HsDHODH* em fusão com a cauda fornecida pelo vetor pET-sumo. A seta vermelha indica onde ocorre a clivagem feita pela protease ULP1. 13
- Figura 11. Interação entre a cauda de histidina da enzima e o níquel da resina Ni-NTA Agarose. A seta indica o sítio de clivagem pela protease ULP1. Figura gentilmente cedida pela Pós-Doutoranda Patrícia Rosa Feliciano, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 16
- Figura 12. Reações de oxidação-redução ocorridas durante o ensaio de atividade da DHODH. 19

- Figura 13.** Eletroforese em gel de agarose a. das amostras de PCR de colônia mostrando os clones positivos (em vermelho) da cepa de *E. coli* DH5 α . b. Gel de agarose da reação de digestão da enzima *SmdHODH* (1074pb) em pET-sumo (5639pb). 25
- Figura 14.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% mostrando a presença de contaminantes após a purificação da *SmdHODH*. A seta rosa mostra a banda referente ao fragmento de *SmdHODH* e a seta verde mostra a banda referente à *sumo*. 1. Marcador de peso molecular (GE Healthcare). 2 a 7. Proteína *SmdHODH* eluindo em torno de 38,9 kDa, na presença de contaminantes.. 28
- Figura 15.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% mostrando as etapas de purificação da proteína *SmdHODH*. M: Marcador de peso molecular (GE Healthcare); 1: Fração solúvel; 2: Efluente; 3: Lavagem da coluna com o tampão A contendo 10 mM de imidazol; 4: Lavagem da coluna com o tampão A contendo 25 mM de imidazol; 5: Eluição da proteína após a primeira etapa de cromatografia por afinidade, em um tampão A contendo 500mM de imidazol; 6: Eluição da proteína após a etapa de exclusão molecular; 7: Eluição da *SmdHODH* (A) após a etapa de clivagem pela ULP1, no tampão A. Seu tamanho esperado é de 38,9 kDa; 8: Eluição da ULP1 (B), bem como da cauda de histidina e da *sumo* (C), na presença do tampão A acrescido de 500 mM de imidazol. 29
- Figura 16.** *SmdHODH* no concentrador, durante a diálise (esquerda), e após concentrar (direita). 29
- Figura 17.** Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% mostrando as etapas de purificação da proteína *HsdHODH*. M: Marcador de peso molecular (GE Healthcare); 1: Fração solúvel; 2: Efluente; 3: Lavagem da coluna com o tampão A contendo 10 mM de imidazol; 4: Lavagem da coluna com o tampão A contendo 25 mM de imidazol; 5: Eluição da proteína após a primeira etapa de cromatografia por afinidade, em um tampão A contendo 500mM de imidazol; 6: Eluição da proteína após a etapa de exclusão molecular; 7: Eluição da *HsdHODH* após a etapa de clivagem pela ULP1, no tampão A. Seu tamanho esperado é de 39,9 kDa; 8: Eluição da ULP1, da cauda de histidina e da *sumo*, na presença do tampão A acrescido de 500 mM de imidazol. 30
- Figura 18.** Espectros de absorção na região do visível das enzimas *SmdHODH* e *HsdHODH*, antes e após aquecimento das amostras. 31
- Figura 19.** Velocidade de formação de orotato para os diferentes pHs testados (monitoramento indireto da redução do DCIP, na presença de coenzima Q₀). Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0. 32
- Figura 20.** Velocidade de formação de orotato para os diferentes pHs testados (monitoramento indireto da redução do DCIP, na ausência de coenzima Q₀). Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0. 32
- Figura 21.** Velocidade de formação de orotato para os diferentes pHs testados (método direto). Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0. 32

- Figura 22. Comparação entre os ensaios de atividade realizados para a as enzimas *SmDHODH* (esquerda) e *HsDHODH* (direita). A. Método direto para *SmDHODH*. B. Método indireto na presença de quinona para *SmDHODH*. C. Método indireto na ausência de quinona para *SmDHODH*. D. Método direto para *HsDHODH*. E. Método indireto na presença de quinona para *HsDHODH*. F. Método indireto na ausência de quinona para *HsDHODH*. Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0..... 34
- Figura 23. Curvas de k_{obs} em função da variação da concentração de substrato obtidas para a enzima *SmDHODH*. 35
- Figura 24. Curvas de k_{obs} em função da variação da concentração de DHO e de Q_0 obtidas para a enzima *HsDHODH*. 35
- Figura 25. Gráfico 3D de k_{obs} em função da variação da concentração dos substratos DHO (μM) e Q_0 (μM) dentro da cinética do estado estacionário para a enzima *SmDHODH*. A curva construída com base nos dados experimentais (esquerda) pode ser comparada com base na curva teórica (direita) calculada, após o ajuste dos dados à equação do Ping-Pong..... 35
- Figura 26. Gráfico 3D de k_{obs} em função da variação da concentração dos substratos DHO (μM) e Q_0 (μM) dentro da cinética do estado estacionário para a enzima *HsDHODH*. A curva construída com base nos dados experimentais (esquerda) pode ser comparada com base na curva teórica (direita) calculada, após o ajuste dos dados à equação do Ping-Pong..... 36
- Figura 27. Perfil de eluição dos marcadores moleculares obtidos com a calibração da coluna Superdex 200 (10/300) (GE®). B. Regressão linear para a determinação da função que correlaciona massa molecular com volume de eluição dos padrões aplicados na coluna Superdex 200 (10/300). $\ln Mr =$ logaritmo neperiano da massa molecular. $K_{av} = (V_e - V_o)/(V_c - V_o)$, onde V_e é o volume de eluição, V_o é o volume de exclusão, e V_c é o volume da coluna..... 37
- Figura 28. Perfil de eluição da *SmDHODH* em coluna Superdex 200 (10/300), equilibrada com tampão Tris 50mM, NaCl 500 mM e 0,05% de Triton em pH 8,5. O gel em SDS-PAGE representa as amostras referentes ao pico de absorção a 450 nm. 38
- Figura 29. Perfil de variação de porcentagem de intensidade de espalhamento e de volume em função da distribuição de tamanho da proteína *SmDHODH* obtido através da técnica de espalhamento dinâmico de luz na presença de agentes tamponantes. Os tampões foram preparados com 50 mM do agente tamponante e 150 mM de NaCl. A concentração final da proteína é de 3mg/mL..... 39
- Figura 30. Perfil de variação de porcentagem de intensidade de espalhamento e de volume em função da distribuição de tamanho da proteína *SmDHODH* obtido através da técnica de espalhamento dinâmico de luz após a realização da cromatografia por exclusão molecular. 39
- Figura 31. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC_{50} , para os experimentos realizados com a enzima *SmDHODH*. 42

Figura 32. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC ₅₀ , para os experimentos realizados com a enzima <i>SmdHODH</i>	43
Figura 33. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC ₅₀ , para os experimentos realizados com a enzima <i>SmdHODH</i>	44
Figura 34. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC ₅₀ , para os experimentos realizados com a enzima <i>SmdHODH</i>	45
Figura 35. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC ₅₀ , para os experimentos realizados com a enzima <i>HsDHODH</i>	46
Figura 36. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC ₅₀ , para os experimentos realizados com a enzima <i>HsDHODH</i>	47
Figura 37. Compostos análogos à quinona testados. A. Anilinonaftoquinonas; B. Tiazol; C. Lapachol e derivados; D. Benzoquinonas comerciais; E. Naftoquinonas; F. Atovaquona.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidades de enzima e de tampões presente nas reações de digestão....	14
Tabela 2. Quantidades de vetor, de inserto e de enzima Ligase (NEB®) presentes na reação.....	15
Tabela 3. Componentes presentes na reação em cadeia da polimerase.....	15
Tabela 4. Parâmetros obtidos para a cinética de estado estacionário para as duas reações catalisadas pelas enzimas <i>SmdHODH</i> e <i>HsDHODH</i>	36
Tabela 5. Valores de porcentagem de inibição da enzima <i>SmdHODH</i> frente a alguns compostos testados em ensaios preliminares.....	41
Tabela 6. Valores de IC ₅₀ , em μM ou em nM, calculados para as enzimas <i>SmdHODH</i> e <i>HsDHODH</i> na presença dos compostos testados.....	48

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. $k_{obs} = \frac{k_{cat} * [DHO] * [Q_0]}{(K_m[DHO] * [Q_0] + K_m[Q_0] * [DHO] + [DHO] * [Q_0])}$ **21**

Equação 2. $y = \frac{A1 - A2}{1 + \exp(\frac{x - x_0}{dx})} + A2$ **24**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A771726	2-ciano-3-hidroxi-N-[4-(trifluorometil)fenil]-2-butenamida
Abs	Absorvância
Arg	Arginina
BCA	Ácido bicinchonínico
BSA	Soro albumina bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Da	Daltons
DCIP	2,6-dicloroindofenol
DCIPH ₂	2,6-dicloroindofenol reduzido
DHO	Diidroorotato
DHODH	Diidroorotato desidrogenase
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
<i>EcDHODH</i>	Diidroorotato desidrogenase de <i>Escherichia coli</i>
FE-3	Benzoquinona
FE-10	2-hidroxinaftaleno-1,4-diona
FE-20	4,5-dicloro-3,6-dioxociclohexa-1,4-dieno-1,2-dicarbonitrila
FE-25	2,5-di-tert-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona
FE-31	2-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona
FE-32	2-(tert-butil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona
FE-35	2,5-difenil-(1,4)benzoquinona
FMN	Flavina mononucleotídeo
FMNH ₂	Flavina mononucleotídeo reduzido
GB-104	bis-(2,4,5-trimetoxifenil)metano
GST	Glutathione S-transferase
<i>HsDHODH</i>	Diidroorotato desidrogenase de <i>Homo sapiens</i>
IC ₅₀	Concentração inibitória responsável por 50% da perda de atividade enzimática
Ile	Isoleucina
IPTG	Isopropiltio-β-D-galactosídeo
kDa	Kilo Daltons
K _M	Constante de Michaelis
LB	Luria-Bertani
LBC-01	2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona
LBC-02	(E)-2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona
LCPSP-002	6,7-dimetil-2-tioxo-2,3-diidro-4(1H)-pteridinona

LCSPSP-3027	6-(butilsulfanil)-1,2,4-triazino-3,5-diol
Leu	Leucina
Log	Logaritmo
Min	Minuto
MPO	2-mercaptopiridina N-óxido
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
Ni-NTA	Ácido nitrilotriacético
ORO	Orotato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Pf</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Plasmodium falciparum</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto fenilmetilsulfonil
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Q ₀	2,3-dimetoxi-5-metil- <i>p</i> -benzoquinona
Q _D	Decilubiquinona
QHM-09	2-hidroxi-3-(fenilamino)naftaleno-1,4-diona
QHM-10	2-hidroxi-3-((4-metoxifenil)amino)naftaleno-1,4-diona
QHM-11	2-((2-clorofenil)amino)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona
QHM-12	2-((2,6-dimetilfenil)amino)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona
QHM-23	2-hidroxi-3-(4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il)naftaleno-1,4-diona
QXOFUR	3,3-dimetil-2-metileno-2,3-diidronafto-[2,3-b]furan-4,9-diona
QXOMT	2-amino-4-metilnafto[1,2-d]tiazol-5-ol
QXONT	2-aminonafto[1,2-d]tiazol-5-ol
RBMLP-16	2-cloronaftaleno-1,4-diona
RBMLP-35	2-cloro-3-(metilamino)naftaleno-1,4-diona
RBMLP-41	2-((1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il)oxi)acetonitrila
RBMLP-42	2-((3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il)oxi)acetonitrila
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
<i>Sj</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Schistosoma japonicum</i>
<i>Sm</i> DHODH	Diidroorotato desidrogenase de <i>Schistosoma mansoni</i>
tRNA	RNA transportador
<i>Tc</i> FHm	Fumarato hidratase de <i>Trypanosoma cruzi</i> mitocondrial
Tris	Tris-(hidroximetil)aminoetano
ULP1	<i>Ubiquitin like protein 1</i>
V _{máx}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
1.1	Esquistossomose, uma doença negligenciada.....	1
1.1.1	Contexto histórico e epidemiologia.....	1
1.1.2	<i>Schistosoma mansoni</i> : ciclo evolutivo, transmissão e sintomatologia.....	2
1.1.3	Diagnóstico, prevenção e tratamento	5
1.2	A enzima diidroorotato desidrogenase	6
1.3	A diidroorotato desidrogenase de <i>Schistosoma mansoni</i>	9
2	Objetivos.....	12
3	Materiais e Métodos	13
3.1	Clonagem das enzimas <i>SmDHODH</i> e <i>HsDHODH</i>	13
3.1.1	Deteção de uma mutação não silenciosa e a subclonagem da <i>SmDHODH</i>	14
3.2	Expressão heteróloga das enzimas <i>SmDHODH</i> e <i>HsDHODH</i>	16
3.3	Purificação da <i>SmDHODH</i> e da <i>HsDHODH</i>	16
3.3.1	Quantificação das proteínas <i>SmDHODH</i> e <i>HsDHODH</i>	17
3.4	Caracterização das enzimas <i>SmDHODH</i> e <i>HsDHODH</i>	18
3.4.1	Medidas de atividade enzimática em diferentes pHs.....	18
3.4.2	Caracterização cinética da <i>SmDHODH</i> e da <i>HsDHODH</i>	20
3.4.3	Avaliação do estado oligomérico da <i>SmDHODH</i>	21
3.4.4	Avaliação da estabilidade da enzima <i>SmDHODH</i>	22
3.5	Teste de atividade das proteínas na presença de inibidores	22
4	Resultados e Discussão.....	25
4.1	Subclonagem e expressão das enzimas.....	25
4.1.1	<i>SmDHODH</i>	25
4.1.2	<i>HsDHODH</i>	27
4.2	Purificação das enzimas.....	27
4.2.1	<i>SmDHODH</i>	27
4.2.2	<i>HsDHODH</i>	30
4.3	Determinação do coeficiente de extinção molar das enzimas.....	30
4.4	Caracterização das enzimas <i>SmDHODH</i> e <i>HsDHODH</i>	31
4.4.1	Medidas de atividade enzimática em diferentes pHs.....	31
4.4.2	Caracterização cinética da <i>SmDHODH</i> e da <i>HsDHODH</i>	34
4.4.3	Avaliação do estado oligomérico e da estabilidade da <i>SmDHODH</i>	37
4.4.4	Ensaio de inibição enzimática	40
5	Conclusões.....	52
6	Referências Bibliográficas.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Esquistossomose, uma doença negligenciada

1.1.1 Contexto histórico e epidemiologia

As doenças infecciosas parasitárias afetam milhões de pessoas nas diferentes regiões mais pobres do planeta e representam um grave problema de saúde pública mundial. Doença de Chagas, tripanossomíase africana, leishmaniose e esquistossomose são responsáveis por incapacitar anualmente uma fração significativa da população de vários países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Essas doenças, consideradas negligenciadas devido à falta de investimentos no desenvolvimento de novas estratégias de prevenção e tratamento pelo setor público e privado, contribuem de forma significativa às taxas de morbimortalidade, bem como para a manutenção do quadro de desigualdade social^[1,2].

A falha na prevenção e diagnóstico precoce, bem como a falta de tratamentos eficazes e com menores efeitos colaterais comprometem de forma significativa o controle destas doenças. Este cenário evidencia a grande necessidade de investimento em novas políticas de controle e prevenção, e também em pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos mais eficazes, de forma a permitir a melhoria na qualidade de vida da população afetada por estas doenças^[3,4,5].

A esquistossomose ou bilharzíase, tema deste projeto, é uma parasitose de veiculação hídrica que afeta 78 países localizados em regiões tropicais e sub-tropicais. Segundo a Organização Mundial de Saúde, trata-se da segunda parasitose humana mais disseminada pelo mundo. Atualmente, estima-se que 249 milhões de pessoas estejam infectadas, e que mais de 800 milhões vivam em áreas endêmicas^[1,6,7]. A grande maioria dos países endêmicos afetados localizam-se na África, na Ásia e nas Américas. Nas Américas, o Brasil é o país que possui a maior área endêmica para a esquistossomose^[1,6,7,8].

No Brasil, a esquistossomose está distribuída entre 19 estados, conforme ilustra a **figura 1**, e chega a acometer cerca de 6 milhões de indivíduos, apresentando uma média de 820 internações e 505 óbitos como relatado para o período de 2000 a 2010. De 2001 a 2011, estudos revelaram através de inquéritos coproscópicos aproximadamente 129818 portadores de *Schistosoma mansoni*. Os Estados de maior prevalência para a doença encontram-se concentrados nas regiões Nordeste e Sudeste do país^[9,10]. Entretanto, estudos recentes da distribuição espacial da esquistossomose nos Estados brasileiros inexistem, e sugere-se que os dados epidemiológicos sejam ainda mais abrangentes^[11].

Figura 1. Áreas endêmicas e focais da esquistossomose *mansoni*. Fonte: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose/Secretaria da Vigilância em Saúde/MS – 2008.

1.1.2 *Schistosoma mansoni*: ciclo evolutivo, transmissão e sintomatologia

A esquistossomose é causada por platelmintos trematódeos dióicos do gênero *Schistosoma* capazes de infectar mamíferos, aves e répteis^[12]. Seis espécies são capazes de parasitar o homem: *S. mekongi*, *S. intercalum*, *S. malayensis*, *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. Destas, as três últimas apresentam maior importância em saúde pública, por serem responsáveis pela maior parte dos casos de esquistossomose, e apenas o agente etiológico *S. mansoni* é encontrado no Brasil^[13]. A **figura 2** ilustra a distribuição destas espécies pelo mundo.

Figura 2. Distribuição das espécies do gênero *Schistosoma* pelo mundo. Fonte: Gryseels *et al.*, 2006 ^[14].

O ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* envolve uma fase de reprodução assexuada no hospedeiro intermediário, um caramujo de água doce do gênero *Biomphalaria*; uma fase sexuada no hospedeiro definitivo, o homem; e dois estágios larvais infectantes, a cercária e o miracídio, ambos adaptados de forma a favorecer a transmissão entre hospedeiros^[8,15].

O ciclo de transmissão (**Figura 3**) se inicia quando o homem é infectado pela cercária. Estas larvas penetram a pele, atingem a corrente sanguínea, e se transformam em esquistossômulos, corpúsculos vivos que perderam a cauda durante a penetração no tecido do hospedeiro. Os esquistossômulos atingem o coração e os pulmões, onde permanecem por algum tempo. Posteriormente atingem os mais diversos órgãos. No fígado, os parasitas jovens amadurecem e se diferenciam sexualmente, tornando-se adultos. Ao retornarem à corrente sanguínea, migram até os vasos mesentéricos, dando início à oviposição. Parte dos ovos liberados atravessam a parede dos vasos mesentéricos e são excretados nas fezes. Outra parte retorna à corrente sanguínea e alcança outros órgãos do hospedeiro. Os ovos excretados nas fezes do hospedeiro definitivo, em contato com a água, liberam miracídios. Estas larvas, guiadas por estímulos luminosos e químicos, penetram no hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*, e se multiplicam de forma assexuada. Diferenciam-se em esporocisto, o qual posteriormente se desenvolve na segunda forma larval, as cercárias, capazes de infectar o homem. Assim o ciclo se reinicia^[7,8,15].

Figura 3. Ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. Fonte: Souza et al., 2011^[16].

Os parasitos possuem sexos separados e acentuado dimorfismo sexual. Os machos adultos medem cerca de 1 centímetro de comprimento e apresentam forma foleácea, enquanto que as fêmeas adultas medem de 1,2 a 1,6 centímetros de comprimento, exibem formato cilíndrico e quando atingem de um a dois anos, chegam a produzir 400 ovos por dia. Indivíduos infectados são capazes de eliminar ovos viáveis de *Schistosoma* por 5 anos em média. No entanto alguns indivíduos chegam a eliminar por mais de 20 anos^[7,8,16].

Inicialmente, com a penetração da cercária na pele ou mucosas, a fase clínica da doença é assintomática ou pode-se observar, em alguns casos, uma manifestação pruriginosa conhecida como dermatite cercariana. Esta fase inicial dura, em média, de 24 a 72 horas, podendo atingir um período de até 15 dias.

Posteriormente, a fase aguda, caracteriza-se por sintomas inespecíficos como febre, mialgia, cefaleia, tosse, diarreia, astenia, náusea e anorexia, e sinais como a hepatoesplenomegalia. Estas manifestações são mais comuns em indivíduos que entram pela primeira vez em contato com águas contendo a forma infectante do parasito. Indivíduos que habitam zonas endêmicas e já entraram em contato diversas vezes com águas contaminadas, em geral, desenvolvem leves manifestações nesta fase clínica.

Na fase crônica o quadro clínico do paciente é variável e a doença pode evoluir para diversas formas clínicas. A forma intestinal pode ser assintomática ou caracterizar-se por diarreias e dores abdominais. Durante a forma hepatointestinal manifestam-se quadros de diarreia e epigastralgia, com hepatomegalia e nodulações características de fibrose do tecido hepático. A forma hepatoesplênica caracteriza-se pela hepatoesplenomegalia, e pode apresentar-se em três estágios: compensada, descompensada e complicada. O paciente encontra-se bastante debilitado, podendo apresentar transtornos na circulação portal, hipertensão, aparecimento de circulação colateral e varizes no esôfago^[7,8].

Os sintomas da esquistossomose mansônica não são ocasionados diretamente pela ação dos parasitas, mas sim devido a uma resposta inflamatória granulomatosa do organismo em torno dos ovos do parasita, uma vez que nem todos os ovos são eliminados pelo organismo. De acordo com a forma clínica desenvolvida, os ovos podem ficar alojados no fígado e no intestino, podendo ocasionar a fibrose e a calcificação destes tecidos. Os granulomas podem bloquear o sistema porta-hepático, gerando uma hipertensão portal. Pode haver acúmulo de líquido na cavidade peritoneal (ascite), com o desenvolvimento de varizes esofágicas, as quais podem romper, desencadeando hemorragias. Casos graves podem ser fatais^[17,18].

É importante mencionar que o parasito e/ou seus ovos podem se alojar ainda fora do sistema portal, gerando as formas ectópica, neurológica, vasculopulmonar e renal da doença. Mesmo que

eventual, a neuroesquistossomose, por exemplo, é a forma mais grave incapacitante desta doença^[7,8].

1.1.3 Diagnóstico, prevenção e tratamento

O diagnóstico da doença é realizado principalmente através do método Kato Katz. Trata-se de uma metodologia simples e de rápida realização, que permite a identificação e posterior contagem dos ovos do parasito em amostras de fezes do indivíduo infectado^[19,20].

Atualmente um fármaco é utilizado para o tratamento da esquistossomose, o praziquantel (**Figura 4**). Este medicamento é uma importante ferramenta para o controle da prevalência a curto prazo e para o controle da morbidade a médio e a longo prazo^[21]. No entanto, o risco de reinfecção é alto, a eficácia desse medicamento é restrita ao estágio adulto do parasita, os efeitos colaterais do fármaco dificultam a adesão do paciente ao tratamento, e o mecanismo de ação do fármaco ainda não é completamente elucidado. Algumas cepas do parasita menos sensíveis ao praziquantel já foram isoladas, e dada a massiva administração do medicamento, a resistência do parasita ao medicamento pode se tornar um sério problema de saúde pública^[22,23].

Figura 4. Estrutura do fármaco praziquantel.

Outra perspectiva envolve o desenvolvimento de vacinas anti-esquistossomose. Dentre os candidatos plausíveis temos as proteínas recombinantes *Sm14*, *Sh28GST*, e *Sm-TSP-2* e o ácido nucléico *Smp80*^[24]. A *Sm14*, em especial, foi desenvolvida por pesquisadores brasileiros do Instituto Oswaldo Cruz. É uma proteína de 14 kDa que liga ácidos graxos e desempenha papel importante de captação, transporte e compartimentalização dos ácidos graxos no parasita^[25]. Ainda que promissoras a longo prazo, estas vacinas encontram-se em fase de formulação (*Sm-TSP-2*), em fase de testes pré-clínicos (*Smp80*) ou em fase inicial de testes clínicos (*Sm14* e *Sh28GST*), além de serem somente um método preventivo contra a doença, mas não curativo, ou terapêutico^[24,26].

Embora atualmente sejam desenvolvidos projetos científicos envolvendo aspectos biológicos, bioquímicos, imunológicos e genéticos de parasitas, estes são muitas vezes interrompidos devido à falta de investimentos dos setores públicos e privados. O desinteresse da indústria farmacêutica, que não vislumbra os indivíduos portadores de parasitoses como compradores

potenciais de novos medicamentos, aliado à falta de fontes públicas de financiamento, dificulta o desenvolvimento de novas terapias seguras e eficazes contra a esquistossomose. Diante do exposto, fica evidente a real necessidade em aprofundar os conhecimentos acerca desta parasitose e validar novos alvos terapêuticos contra a esquistossomose.

É dentro deste contexto que o presente projeto se insere, e que dá início à investigação do papel da enzima diidroorotato desidrogenase de *Schistosoma mansoni* como possível alvo de terapêutico para o planejamento de novas terapias anti-esquistossomose.

1.2 A enzima diidroorotato desidrogenase

A enzima diidroorotato desidrogenase (DHODH) tem sido considerada o alvo promissor no desenvolvimento de fármacos com atividade anti-inflamatória, imunossupressora, antiproliferativa e antiparasitária^[27,28,29,30,31]. Experimentos de “*Knock out*” do gene que codifica a enzima DHODH de *Trypanosoma cruzi* mostram que esta enzima é essencial para a sobrevivência do parasito^[32]. Compostos como Leflunomida (ARAVA®), aprovado para o tratamento de artrite reumática, Brequinar, testado como antineoplásico e Atovaquona (Malarone®), medicamento anti-malária ratificam o potencial terapêutico da inibição desta via metabólica, através da inibição específica da enzima DHODH.

Em organismos multicelulares, a via metabólica de salvação satisfaz as necessidades de pirimidina sob circunstâncias normais. No entanto, células que proliferam rapidamente e parasitas dependem da biossíntese *de novo* de pirimidinas para a síntese eficiente de precursores de ácidos nucleicos^[33].

A enzima diidroorotato desidrogenase participa da via metabólica de biossíntese *de novo* de nucleotídeos pirimidínicos (Figura 5). Na quarta e única etapa de oxi-redução da via metabólica, esta flavoenzima catalisa a conversão do substrato L-diidroorotato (DHO) em orotato (ORO) em um mecanismo michaeliano do tipo ping-pong^[34,35,36].

Figura 5. Via da biossíntese *de novo* de nucleotídeos pirimidínicos. Figura adaptada de Nelson e Cox (2008)^[37].

A importância da via *de novo* de biossíntese de pirimidinas, associada ao fato de que a inibição específica da enzima DHODH leva à inibição desta via metabólica, faz com que exista um grande interesse em investigar a inibição da enzima DHODH como estratégia terapêutica no tratamento de doenças que envolvem grande proliferação celular e/ou parasitárias.

As enzimas DHODHs são divididas em 2 classes, de acordo com suas características estruturais e de localização celular. Enquanto as enzimas da classe 1 são encontradas em bactérias Gram-positivas, fungos anaeróbicos e eucariotos inferiores, as enzimas da classe 2 são encontradas em eucariotos e alguns procariotos, como por exemplo bactérias Gram-negativas. As enzimas da classe 1, subdivididas em 1A e 1B, são encontradas no citosol, e as enzimas pertencentes à classe 2 são encontradas associadas à membrana citosólica ou mitocondrial. Esta particularidade das DHODHs da classe 2 se deve à presença de um domínio hidrofóbico em hélice na região N-terminal (Figura 6) que permite a ancoragem das mesmas à membrana^[36,38,39].

Figura 6. Estruturas cristalográficas das enzimas HsDHODH (*Homo sapiens*, PDB ID 2WV8), EcDHODH (*Escherichia coli*, PDB ID 1F76) e PfDHODH (*Plasmodium falciparum*, PDB ID 3I68) sobrepostas. As hélices pertencentes ao domínio de ancoragem à membrana da região N-terminal das enzimas HsDHODH, EcDHODH e PfDHODH estão representadas pelas cores rosa, amarela e cinza, respectivamente. No centro das estruturas, em amarelo, está o cofator flavina mononucleotídeo (FMN).

Outra diferença que pode ser destacada refere-se aoceptor final de elétrons da reação catalisada pelas DHODHs. As enzimas da classe 1 utilizam como aceptores de elétrons moléculas de oxigênio ou moléculas hidrossolúveis, como fumarato ou NAD⁺, e as enzimas da classe 2 utilizam moléculas de caráter hidrofóbico, como por exemplo a ubiquinona. Estas moléculas oxidam FMNH₂ para a regeneração de FMN^[34,40].

A estrutura em barril α/β é semelhante nas duas classes: o domínio catalítico consiste em uma região central formada por 8 fitas beta paralelas rodeadas por 8 α -hélices. No topo do barril, três fitas β antiparalelas formam uma espécie de “tampa” que cobre o sítio redox, enquanto que a outra extremidade do barril é formada por um par de fitas β antiparalelas. O sítio de ligação do orotato é localizado na parte superior do barril, onde várias fitas formam o bolso de ligação do substrato e do FMN^[41] (**Figura 7**).

Figura 7. Estrutura cristalográfica da enzima *HsDHODH* (*Homo sapiens*, PDB ID 2WV8), evidenciando o motivo barril α/β , o FMN em amarelo, e o produto da reação, orotato, em verde.

O resíduo que atua como base catalítica na primeira etapa da reação é a cisteína para a classe 1, enquanto que um resíduo de serina é encontrado em membros da classe 2^[35,36,42]. O estado oligomérico também pode variar. Membros da classe 1A são diméricos e estudos de mutagênese sítio dirigida sugeriram que a dimerização nas enzimas da classe 1A é essencial para a atividade catalítica^[43]. Membros da classe 1B são heterotetraméricos e membros da classe 2 são descritos como funcionais na forma monomérica^[44].

O ciclo catalítico das DHODHs pode ser dividido em duas etapas reacionais. Na primeira etapa, a enzima utiliza como cofator a flavina mononucleotídeo, que é reduzido enquanto o substrato DHO é oxidado. Na segunda etapa da reação, FMN é reoxidado através do auxílio de um agente oxidante cuja natureza varia entre as enzimas de diferentes origens biológicas. Este agente é tido como o segundo substrato da reação^[40] (**Figura 8**).

Figura 8. A. Reação de óxido-redução catalisada pela enzima DHODH. O hidrogênio H* é transferido para FMN como um hidreto, e o hidrogênio H' é perdido como um próton. **B.** No caso das enzimas membros da classe 1A, como de *Leishmania major* e *Trypanosoma cruzi*, fumarato é o agente oxidante, responsável pela oxidação do FMNH₂ a FMN. **C.** No caso da enzima humana e de *Schistosoma mansoni*, ubiquinona é o agente oxidante. Figura gentilmente cedida pela aluna Renata Almeida Garcia Reis, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

1.3 A diidroorotato desidrogenase de *Schistosoma mansoni*

A análise da estrutura primária da enzima DHODH de *Schistosoma mansoni* (*SmDHODH*) (GenBank ID: CCD78646) revela que esta proteína pertence à família 2 das DHODHs. A *SmDHODH* apresenta 379 resíduos de aminoácidos, peso molecular de 41289,2 Da e pI estimado em 9,06^[45].

Embora a enzima pertença à classe 2 das DHODHs, compartilha baixa identidade sequencial com enzimas da classe 2. A *SmDHODH* compartilha 45,5% de identidade sequencial com a enzima DHODH de *Homo sapiens* (*HsDHODH*), 35,9% de identidade com a DHODH de *Plasmodium falciparum* (*PfDHODH*) e 41,0% de identidade com a DHODH de *Escherichia coli* (*EcDHODH*) (**Figura 9**)^[46]. Estas análises preliminares indicam que, embora o mecanismo de catálise deva ser similar, a enzima *SmDHODH* possui características particulares que a difere de outros membros da classe 2 e que poderão, futuramente, ser exploradas para a busca de inibidores seletivos da *SmDHODH*. A *SmDHODH* ainda compartilha 85,4% de identidade sequencial com a *SjDHODH* (*Schistosoma japonicum*)^[46], o que sugere que inibidores identificados para a *SmDHODH* podem ser potenciais inibidores da *SjDHODH*. As sequências dos genes que codificam as enzimas DHODHs de *S. haematobium*, *S. intercalum*, *S. malayensis* e *S. mekongi* ainda não se encontram disponíveis, impossibilitando estudos comparativos entre as proteínas de diferentes espécies de *Schistosoma*.

Figura 9. Alinhamento das enzimas *HsDHODH*, *SmDHODH*, *SjDHODH*, *PfDHODH* e *EcDHODH*. O domínio de interação com a membrana característico da classe 2 está próximo à região N-terminal (hélices $\alpha 1$ e $\alpha 2$). O resíduo de serina catalítico conservado nestas espécies está representado em azul. A sequência correspondente ao peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria predito para *HsDHODH* está representada com um traço laranja, e a sequência correspondente à hélice transmembrana predita para *HsDHODH* está representada com um traço verde (resíduos 12 a 29) ^[47].

Sabe-se que o parasito *Schistosoma mansoni* não é capaz de sintetizar nucleotídeos purínicos pela via *de novo*, dependendo exclusivamente da via de salvação para suprir suas necessidades de purinas^[48, 49]. No entanto, todas as vias metabólicas de biossíntese de pirimidinas são funcionais no

parasito: a via *de novo*, a via de salvação^[50,51,52] e o ciclo do timidilato^[53, 54]. Em particular, estágios celulares de rápida proliferação dependem da biossíntese *de novo* de pirimidinas para a síntese eficiente de precursores de ácidos nucleicos^[33,51].

Sendo assim, considerando a importância da produção de nucleotídeos para a execução de inúmeras funções essenciais às células, as potenciais diferenças existentes entre o metabolismo de pirimidinas no parasito e no homem e a diferença de identidade sequencial entre as enzimas de *Schistosoma mansoni* e humana, se tornou nosso interesse avaliar o papel da enzima DHODH de *Schistosoma* e investigar seu potencial como alvo para o desenvolvimento de novas terapias contra a esquistossomose.

Como uma primeira etapa considerando este contexto, o presente projeto dá início aos estudos de caracterização bioquímica, biofísica, bem como a realização de ensaios de inibição enzimática, fornecendo dados importantes não só para a caracterização funcional da enzima como também para o futuro planejamento de ligantes específicos baseados na estrutura e função proteica.

A longo prazo, o objetivo é identificar ligantes específicos e seletivos para a enzima do parasito e realizar ensaios *in vivo* na presença destes ligantes, para avaliar o potencial destas moléculas no controle da progressão da doença em modelos animais infectados com o parasito.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do projeto é dar início à caracterização da enzima *SmDHODH*, um importante passo para a validação da enzima como alvo terapêutico para o planejamento de fármacos anti-esquistossomose.

Os objetivos específicos são:

1. Realizar estudos de caracterização bioquímica e biofísica da *SmDHODH*, que envolvem: a avaliação do estado oligomérico da *SmDHODH* por cromatografia de exclusão molecular e por espalhamento dinâmico de luz; a caracterização cinética da enzima, com a determinação do pH ótimo de atuação da enzima e determinação das constantes catalíticas K_M e $V_{m\acute{a}x}$; a realização de estudos de estabilidade química da enzima *SmDHODH* em diversos agentes tamponantes, utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz;
2. Identificar inibidores da enzima *SmDHODH* utilizando bancos de moléculas de origem natural e sintética disponibilizados por nossos colaboradores, em particular um banco de moléculas análogas à quinona, elaborado pelo Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, da FCFRP-USP;
3. Realizar ensaios de caracterização bioquímica e ensaios de validação cruzada com a enzima DHODH humana, utilizando os mesmos agentes tamponantes e os mesmos bancos de moléculas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Clonagem das enzimas *SmDHODH* e *HsDHODH*

O gene que codifica a enzima DHODH de *Schistosoma mansoni* foi inicialmente clonado em nosso laboratório pelo pós doutorando Ricardo Augusto Pereira de Pádua, utilizando o vetor de expressão pET-sumo. Para possibilitar a realização de ensaios comparativos e de validação cruzada com a enzima DHODH de *Homo sapiens*, o gene que codifica a enzima humana foi também clonado no mesmo vetor de expressão, pET-sumo, utilizando como molde a construção em pET22b gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Jon Clardy, da Universidade de Harvard. A enzima humana havia sido clonada com a deleção do peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria predito, bem como com a deleção da região hidrofóbica predita como uma hélice transmembrana^[47] (Seção 1.3, Figura 9). DA mesma forma, a clonagem da *SmDHODH* foi realizada também com a deleção referente à região correspondente ao peptídeo sinal e à região transmembrana, preditas por similaridade sequencial com a enzima humana (Seção 1.3, Figura 9). A construção final para a enzima *SmDHODH* compreende os resíduos 23 a 379 e para a *HsDHODH* humana, os resíduos 29 a 395.

O pET é um plasmídeo que permite uma rápida produção de grandes quantidades da proteína de interesse. O plasmídeo é composto do gene *lac-1*, que codifica o repressor *lac*; o promotor T7, altamente específico para a T7 RNA polimerase; o operador *lac*, onde se liga o repressor *lac*, e que controla o processo da transcrição; um gene que confere resistência a um antibiótico; e um sítio múltiplo de clonagem, onde o gene de interesse é inserido.

Na construção pET-sumo a proteína de interesse sem o peptídeo sinal se encontra fusionada a uma cauda à região N-terminal. Esta cauda contém a proteína sumo, de aproximadamente 15 kDa, e um peptídeo específico para a remoção da cauda através da digestão com a enzima *Ubiquitin Like Protein 1* (ULP1) (Figura 10). As enzimas também estão fusionadas a um peptídeo de seis histidinas para facilitar os experimentos de purificação.

Figura 10. Ilustração da construção das proteínas *SmDHODH* e *HsDHODH* em fusão com a cauda fornecida pelo vetor pET-sumo. A seta vermelha indica onde ocorre a clivagem feita pela protease ULP1.

A sumo tem sido muito eficaz na solubilização de diferentes proteínas^[55]. Aliado a este fato, possuímos em nosso laboratório a construção que permite a expressão e a purificação da protease ULP1, o que torna o custo e a metodologia viáveis.

3.1.1 Detecção de uma mutação não silenciosa e a subclonagem da *SmDHODH*

O sequenciamento do fragmento de DNA clonado em pET-sumo revelou a presença de uma mutação pontual não silenciosa no nucleotídeo de número 436 (resíduo de aminoácido 146), onde foi observada a troca do códon GAT pelo códon TAT (direção 5'→3'). Essa mutação levaria à expressão da proteína onde um resíduo de tirosina (codificado pelo códon TAT) ocuparia o lugar de um resíduo de aspartato.

No protocolo original o gene que codifica a enzima de interesse havia sido amplificado a partir do cDNA, gentilmente cedido pelo Dr. Humberto D'Muniz Pereira, e clonado inicialmente no vetor de clonagem pTZ57R/T. Uma das colônias foi selecionada como molde para a subclonagem no vetor de expressão pET-sumo.

Uma vez detectada a mutação, foi realizado o sequenciamento de diferentes clones em pTZ57R/T e uma construção identificada por não conter a mutação foi utilizada como molde para uma nova subclonagem.

Amostras da construção *SmDHODH* sem o peptídeo sinal em pTZ57R/T e da construção *TcFHm* (enzima fumarato hidratase mitocondrial de *Trypanosoma cruzi*) em pET-sumo foram submetidas a dupla digestão pelas enzimas de restrição BamHI-Hf e XhoI (NEB – New England Biolabs®). A construção *TcFHm* desenvolvida em nosso laboratório^[56] foi utilizada como molde para o vetor a fim de permitir o controle dos experimentos de digestão. Estas reações foram montadas conforme descrito na **Tabela 1** e mantidas em banho a 37°C por três horas.

Tabela 1. Quantidades de enzima e de tampões presente nas reações de digestão.

Componente da Reação	<i>SmDHODH</i> em pTZ	<i>TcFHm</i> em pET-sumo
DNA	4uL (~1 µg)	5uL (~1 µg)
BamHI-HF	1 µL (1 unidade)	1 µL (1 unidade)
XhoI	1 µL (1 unidade)	1 µL (1 unidade)
Tampão n°4 10x NEB®	5 µL	5 µL
BSA 100x	0,5 µL	0,5 µL
Água	38,5 µL	37,5 µL
Volume total	50 µL	50 µL

Após a digestão, as amostras referentes ao inserto *SmDHODH* e ao vetor pET-sumo foram purificadas do gel de agarose a 0,8% com o auxílio do kit QiaQuick Gel Extraction (Qiagen®) e foram submetidas à reação de ligação por vinte minutos a 22°C, conforme descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2. Quantidades de vetor, inserto e enzima Ligase (NEB®) presentes na reação.

Componente da Reação	Quantidade
pET-sumo	~30 ng
Inserto	~34,5 ng
T4 DNA Ligase	1 µL
Tampão da ligase 10x NEB®	1 µL
Água	5,25 µL
Volume total	10 µL

A cepa de *Escherichia coli* DH5α quimiocompetente (Invitrogen®), obtida através do uso do protocolo elaborado por Ausubel *et al.*^[57], foi transformada com o produto final da reação de ligação e, para checarmos a presença do gene de interesse nas colônias obtidas, foi realizado um experimento de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando as diferentes colônias como moldes.

Neste experimento de PCR utilizamos os primers forward 5' AGT GGA TCC TTG TAC TCT GGA AAT GAG CAC TTT TAT AAA G 3' e reverse 5' CTG CTC GAG TTA AGA TGT CAT TTT TAA TTT ATT AAT TTC T 3' (com sítios de restrição para as enzimas BamHI e XhoI sublinhados). O programa foi montado em três etapas: desnaturação a 96°C por 3 minutos, 30 ciclos de anelamento (96°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 66 segundos) e extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram montadas conforme descrito na **Tabela 3**.

Tabela 3. Componentes presentes na reação em cadeia da polimerase.

Componente da Reação	Quantidade para 9 reações	Concentração final
Enzima Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas®)	0,4 µL	1,8 unidade
dNTP mix	1,8 µL	0,2 mM
MgCl ₂	10,8 µL	3 mM
Primer forward	0,9 µL	1 µM
Primer reverse	0,9 µL	1 µM
Tampão Taq 10x	9 µL	1x
Água	66,2 µL	-
Volume total	90 µL	-

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 0,8%. O DNA plasmidial das bactérias que possuíam o clone positivo foi extraído com o auxílio do kit Miniprep (Promega® Cat. No A1330) e a construção foi submetida a sequenciamento de DNA. O sequenciamento mostrou que a subclonagem do gene de interesse foi realizada com sucesso.

3.2 Expressão heteróloga das enzimas *SmDHODH* e *HsDHODH*

A cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) quimiocompetente (Invitrogen®), foi transformada com o plasmídeo conforme estabelecido pelo protocolo elaborado por Sambrook *et al.*^[58].

Os ensaios de expressão foram realizados utilizando a cepa BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL (Stratagene, Cat. No 230245) de *Escherichia coli*, em 1 L de meio de cultura rico (composto por 20 g de triptona, 15 g de extrato de levedura, 8g de cloreto de sódio, 2g de fosfato dibásico de sódio e 1g de fosfato monobásico de potássio), na presença dos antibióticos kanamicina (30 µg/mL) e cloranfenicol (34 µg/mL). A expressão das proteínas foi induzida com 100 µM de IPTG, a 18°C, por 24 horas, conforme protocolo otimizado em nosso laboratório.

3.3 Purificação da *SmDHODH* e da *HsDHODH*

As células de *E. coli* presentes em 1L de meio de cultura foram inicialmente isoladas por centrifugação e ressuspensas em 60mL de tampão de lise (imidazol a 10 mM, tris base pH 7.5 a 50 mM, triton X-100 a 1%, cloreto de sódio a 600 mM, glicerol a 10%, fluoreto de fenilmetilsulfonila a 1mM e 1 tablete de coquetel inibidor de proteases Sigma® Cat. No. S8830). Posteriormente esta suspensão foi sonicada (15 ciclos de 30 segundos cada, com pausa de 30 segundos entre um ciclo e outro), incubada a 4°C sob agitação por 30 minutos e centrifugada por 30 minutos a 16100g.

A primeira etapa de purificação consistiu em uma cromatografia clássica por afinidade em coluna de Ni-NTA (ácido nitrilotriacético) Agarose (Qiagen). A construção elaborada possui uma cauda de histidina capaz de interagir com a resina de níquel Ni-NTA Agarose (Qiagen) (**Figura 11**).

Figura 11. Interação entre a cauda de histidina da enzima e o níquel da resina Ni-NTA Agarose. A seta indica o sítio de clivagem pela protease ULP1. Figura gentilmente cedida pela Pós-Doutoranda Patrícia Rosa Feliciano, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

A fração solúvel obtida após a lise foi homogeneizada com a resina previamente equilibrada com o tampão A (tris base pH 7.5 a 50 mM, triton X-100 a 0,15%, cloreto de sódio a 600 mM e glicerol a 10%) acrescido de imidazol a 10 mM. Para evitar a precipitação da fração solúvel na coluna, a resina foi colocada em um béquer e, sob agitação, frações de 5 ml foram adicionadas separadamente na resina, isto é, a cada 5 mL a resina era recolocada na coluna e o *flow through* era descartado. A resina foi lavada com 30mL de tampão A acrescido de imidazol a 10 mM de forma a favorecer a eluição de impurezas e uma lavagem com o tampão A acrescido de imidazol a 500 mM permitiu a eluição da construção completa (com a sumo e a cauda de histidina).

A proteína foi concentrada até o volume de 0,5 mL e em seguida aplicada em uma coluna cromatográfica *HiTrap Desalting* (GE® Cat. No. 17-1408-01) previamente equilibrada com o tampão A, sob fluxo de 1mL/min, no sistema Akta Purifier, com o objetivo de retirar o imidazol da solução contendo a proteína. As frações contendo a proteína de interesse foram colocadas em um tubo cônico de 15 mL e adicionou-se o equivalente a 500 µg da protease ULP1 a este tubo. Após incubação por 2 horas, a 4°C, a mistura é novamente aplicada na coluna cromatográfica de afinidade Ni-NTA Agarose (Qiagen®) e a proteína é eluída sem a presença da fusão cauda de histidina sumo, que fica retida na resina, sendo esta posteriormente eluída na presença de 500 mM de imidazol.

3.3.1 Quantificação das proteínas *SmDHODH* e *HsDHODH*

As frações contendo a proteína de interesse foram concentradas e quantificadas através da utilização de dois métodos distintos. O primeiro método se baseia na leitura da absorbância de um complexo formado em meio alcalino entre a proteína, os íons cobre e o reagente colorimétrico ácido bicinchonínico, em um leitor automático de microplacas, a um comprimento de onda de 562nm^[59]. A partir da curva de calibração construída com o padrão albumina pode se determinar a concentração da *SmDHODH*. Para este ensaio foi utilizado o kit “*BCA Protein Assay*” (Pierce® Cat. nº 23225, Thermo Scientific).

O segundo método utilizado para determinação das concentrações de *SmDHODH* e *HsDHODH* baseou-se na determinação e utilização do coeficiente extinção molar do grupo prostético flavina mononucleotídeo (FMN) para o comprimento de onda de máximo de absorbância de cada proteína. Para cada uma dessas proteínas existe um ponto máximo de absorbância, resultante do tipo particular de complexação do FMN, e distinto de 450nm, característico para a borda de absorção do FMN livre.

Os experimentos de dosagem utilizando a borda de absorção do FMN livre foram feitos em triplicata, isolando a flavina da proteína. Para tanto, as amostras proteicas foram colocadas em tubos de 1,5 mL, recobertas com papel alumínio e aquecidas a 80°C por 5 min para desnaturação e consequente liberação do FMN. Após centrifugação em temperatura ambiente, a porção do

sobrenadante, a qual contém o cofator FMN, foi separada do precipitado. Espectros de absorção na região do visível para ambas as proteínas demonstraram claramente o deslocamento do pico para $\lambda=450$ nm, pico de absorbância característico do cofator FMN livre em solução.

O valor da absorbância em 450 nm foi então utilizado para determinar a concentração de FMN livre ($\epsilon_{FMN450\text{ nm}} = 12,25 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que por sua vez foi correlacionado com a concentração total de proteína. Considerando que cada cadeia de DHODH complexa uma molécula de FMN, e que a relação entre absorbância e concentração segue a lei de Lambert-Beer, foi possível determinar o coeficiente de extinção molar referente ao pico máximo de absorção ($\epsilon_{\text{prot } \lambda_{\text{máx abs}}}$) característico de cada enzima, conforme a relação abaixo:

$$\frac{\epsilon_{FMN450\text{ nm}}}{\epsilon_{\text{prot } \lambda_{\text{máx abs}}}} = \frac{Abs_{FMN}}{Abs_{\text{prot}}}, \text{ tal que } \frac{Abs_{\text{prot}}}{\epsilon_{\text{prot } \lambda_{\text{máx abs}}}} = \frac{Abs_{FMN}}{\epsilon_{FMN450\text{ nm}}},$$

em que Abs_{prot} refere-se ao valor de absorção média da proteína antes a fervura das amostras e Abs_{FMN} refere-se ao valor de absorção média do FMN, após a fervura das amostras de proteína.

3.4 Caracterização das enzimas *SmDHODH* e *HsDHODH*

3.4.1 Medidas de atividade enzimática em diferentes pHs

Com o objetivo de avaliar qual a faixa de pH mais adequada para a realização dos experimentos de cinética enzimática e de inibição, medidas de atividade da *SmDHODH* e da *HsDHODH* foram realizadas variando-se o pH de 6,0 a 10,0.

Para estas medidas utilizamos dois métodos distintos. No primeiro método as medidas de atividade foram realizadas a 25 °C, de forma indireta, utilizando o reagente colorimétrico 2,6-dicloroindofenol (DCIP) como acceptor final de elétrons (**Figura 12**). A redução do reagente DCIP é estequiometricamente equivalente à oxidação de diidroorotato^[60]. Ao oxidar a quinona reduzida, o reagente DCIP (coloração azul) é reduzido à DCIPH₂ (incolor).

Os tampões utilizados continham agente tamponante (variável, de acordo com o pH) a 50 mM, cloreto de potássio a 150 mM, DCIP a 100 µM, triton X-100 a 0,01 %, DHO a 500 µM e coenzima Q₀ a 100 µM. Também foram realizados ensaios com estes tampões, porém sem a presença da coenzima Q₀.

Figura 12. Reações de oxidação-redução ocorridas durante o ensaio de atividade da DHODH.

No segundo método as medidas de atividade foram realizadas a 25 °C, de forma direta, isto é, monitoramos a formação de orotato, a qual é estequiometricamente equivalente à oxidação de diidroorotato^[60].

Para possibilitar a medida de formação de orotato, foi necessário realizar a troca do detergente triton X-100 pelo detergente thesit® (Fluka, Cat. No. 17228), uma vez que a presença do detergente triton X-100 interfere significativamente na medida de absorvância, ao utilizar comprimento de onda de 287 nm e 300 nm. A purificação da enzima procedeu conforme descrito na seção 3.3, entretanto, utilizou-se, na etapa de lise, o detergente thesit a 1%, e nas demais etapas, a concentração de 0,05% deste detergente.

Os tampões utilizados neste ensaio continham agente tamponante (variável) a 50 mM, cloreto de potássio a 150 mM, thesit a 0,05 %, DHO a 500 µM e coenzima Q₀ a 100 µM.

Os testes de atividade, para ambos os métodos, foram realizados em triplicata, em 202 µL de volume final. A reação inicia-se com a adição de 2 µL da enzima a 80 nM em um poço de uma placa de 96 poços e a perda da absorbância do DCIP a 610nm ($\epsilon = 21500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ou a formação de orotato a 287nm ($\epsilon = 6080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi monitorada. A taxa de redução do DCIP/formação de orotato foi determinada a cada 4 segundos, por um período total de 300 segundos. Os experimentos foram realizados em um leitor de microplacas modelo SpectraMax Plus 384, da Molecular Devices.

3.4.2 Caracterização cinética da *SmDHODH* e da *HsDHODH*

Segundo a literatura, a enzima DHODH segue a cinética de Michaelis-Menten catalisando reações que envolvem dois substratos, de acordo com o mecanismo de dupla-troca ou ping-pong^[61]. Neste mecanismo, a reação se inicia com a formação do complexo enzima-substrato (ES_1), onde S_1 corresponde à molécula de L-diidroorotato (DHO). A molécula de orotato, correspondendo ao produto da reação P_1 , é liberada deixando a enzima na forma modificada pela redução do cofator FMN (E'). Na segunda parte da reação, um segundo substrato, S_2 (ubiquinona) se liga à enzima modificada ($E'S_2$) para a formação do segundo produto catalisado pela reação, quinona reduzida (P_2), regenerando a enzima para novos ciclos de catálise. A reação enzimática do tipo ping-pong pode ser resumida como segue:

Para a caracterização cinética das enzimas, as medidas de atividade foram realizadas de forma direta, através da monitorização da formação de orotato, a 300 nm, e de forma indireta, através do ensaio espectrofotométrico que utiliza o DCIP como acceptor final de elétrons.

O teste indireto (205 µL de volume final) foi realizado em um leitor de microplacas, em quintuplicata, com a adição de 60 µM DCIP, 50 mM tris pH 8,15, 150 mM de cloreto de potássio, 0,01 % triton X-100 e concentrações variadas de coenzima Q_0 e DHO. Para a *SmDHODH* os experimentos foram realizados variando a concentração de DHO (31,5 µM; 62,5 µM; 125 µM; 250 µM; 500 µM; 1000 µM) e de Q_0 (31,5 µM; 62,5 µM; 125 µM; 250 µM; 500 µM; 750 µM; 1000 µM). Para a *HsDHODH*, os valores de DHO utilizados nos experimentos foram 62,5 µM; 125 µM; 250 µM; 500 µM; 750 µM; 1000 µM; 1500 µM; 2000 µM, e de Q_0 foram 62,5 µM; 125 µM; 250 µM; 500 µM; 750 µM; 1000 µM; 1500 µM.

A reação inicia-se com a adição de 5 µL da enzima, e a concentração final em solução consistiu em 30 nM para a *SmDHODH* e 40 nM para a enzima *HsDHODH*. A perda da absorbância do DCIP a 610nm ($\epsilon = 21500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi monitorada.

O teste direto (202 µL de volume final) foi realizado em um leitor de microplacas, em triplicata, com a adição de 50 mM tris pH 8,15, 150 mM KCl, 0,05 % thesit e concentrações variadas de coenzima Q₀ e DHO. A reação inicia-se com a adição de 2 µL da enzima *SmDHODH* ou da enzima *HsDHODH*, de forma que a concentração final em solução consistiu em 90 nM para a *SmDHODH* e 80 nM para a enzima *HsDHODH*. A formação de orotato a 300 nm ($\epsilon = 2650 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi monitorada.

A taxa de redução do agente DCIP ou de formação de orotato foi determinada por um período de 120 segundos, com leitura a cada 4 segundos. Os experimentos foram realizados em um leitor de microplacas, modelo SpectraMax Plus 384, da Molecular Devices.

A determinação dos parâmetros cinéticos K_m e k_{cat} foram obtidos através do ajuste dos dados à equação do Ping-Pong (**Equação 1**), utilizando o programa SigmaPlot 11.0:

$$k_{obs} = \frac{k_{cat} * [DHO] * [Q_0]}{(K_m[DHO] * [Q_0] + K_m[Q_0] * [DHO] + [DHO] * [Q_0])} , \quad (1)$$

em que k_{obs} corresponde à taxa de formação do produto por tempo por quantidade de proteína, $[DHO]$ e $[Q_0]$ correspondem às concentrações de diidroorotato e quinona utilizados, respectivamente, e K_m é a concentração de substrato que corresponde à metade da velocidade máxima, e pode ser associada com a afinidade da enzima pelo substrato. O parâmetro k_{cat} corresponde ao valor de formação de produto por tempo, por quantidade de proteína, em condições de saturação.

3.4.3 Avaliação do estado oligomérico da *SmDHODH*

Para avaliação do estado oligomérico da enzima foram realizados experimentos de cromatografia por exclusão molecular e de espalhamento dinâmico de luz.

3.4.3.1 Cromatografia por exclusão molecular

Para a aplicação da técnica de cromatografia por exclusão molecular ou filtração foi utilizada a resina Superdex 200 10/300 (GE), formada por ligações covalentes entre dextran e agarose. A matriz de uma coluna do tipo filtração em gel possui poros de diferentes tamanhos em ambos os casos determinados pelas cadeias de dextran, permitindo assim que proteínas menores penetrem esses poros e percorram um caminho mais sinuoso. Já as macromoléculas maiores, por não penetrarem nos poros, percorrem um caminho menor e são eluídas primeiro^[61].

A coluna Superdex 200 (10/300) foi inicialmente calibrada sob fluxo de 0,75 mL/min, na presença do tampão pH 8,5 contendo tris a 50mM, cloreto de sódio a 500 mM, e triton X-100 a 0,05%, utilizando marcadores moleculares de tamanhos conhecidos para a determinação da função

que correlaciona massa molecular com volume de eluição. Os marcadores utilizados foram: aprotinina (6,5 kDa), ribonuclease (13,7 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa) e ferritina (440 kDa).

Posteriormente, o volume de 0,5 ml da proteína *SmDHODH* foi aplicado na coluna de filtração em gel previamente equilibrada com o tampão pH 8,5 contendo tris a 50mM, cloreto de sódio a 500 mM, e triton X-100 a 0,05%, sob fluxo de 0,75 mL/min. A eluição foi monitorada a 214 nm, a 280 nm e a 450 nm, e as frações coletadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e por espalhamento dinâmico de luz. Estes experimentos foram realizados no sistema Akta Purifier (GE), cedido pelo Prof. Dr. Antonio José da Costa Filho, do Laboratório de Biofísica Molecular da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto.

3.4.3.2 Espalhamento dinâmico de luz

Para a realização das medidas de espalhamento dinâmico de luz foi utilizado o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), gentilmente cedido pela Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

A medida para avaliar o estado de oligomerização da *SmDHODH* foi realizada com a proteína numa concentração aproximada de 3 mg/ml, na presença do tampão de purificação A, e após a cromatografia por exclusão molecular. Um volume de 40 µL da proteína foi colocado na cubeta ZEN2112 (Hellma®), e a medida realizada após o tempo de equilíbrio de 60 segundos, com ângulo de medida de 90°.

3.4.4 Avaliação da estabilidade da enzima *SmDHODH*

As medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS) permitiram uma melhor compreensão do tamanho de partícula, peso molecular, forma e interações feitas pela enzima *SmDHODH*.

As medidas para avaliar a estabilidade e o estado de oligomerização da *SmDHODH* foram feitas na presença de diversos agentes tamponantes, com a proteína numa concentração aproximada de 3 mg/ml. Um volume de 40 µL da proteína em determinado tampão foi colocado na cubeta ZEN2112 (Hellma®), e a medida realizada após o tempo de equilíbrio de 60 segundos, com ângulo de medida de 90°.

3.5 Teste de atividade das proteínas na presença de inibidores

Ao longo do desenvolvimento deste projeto, vários compostos foram testados a fim de se avaliar seus potenciais inibitórios com relação à enzima *SmDHODH*. Dentre os compostos que foram

capazes de inibir a enzima, selecionamos os de maior potencial de inibição para testes de validação cruzada contra a enzima humana.

Nosso laboratório tem grande interesse na validação de novos alvos, assim como na identificação de ligantes específicos para nossas enzimas de interesse, a fim de contribuir para a caracterização do mecanismo de ação das mesmas. Dentro deste contexto, nosso grupo colabora com diferentes grupos de pesquisa que trabalham na obtenção de compostos químicos de origem sintética e/ou produtos naturais.

No caso particular deste projeto, destaca-se a colaboração com a Profa. Dra. Dinorah Gambino, do departamento de Química Inorgânica da Faculdade de Química, UDELAR de Montevideu, Uruguai; com o Dr. Venugopala Narayanaswamy, do Departamento de Biotecnologia e Tecnologia Alimentícia, Durban University of Technology, África do Sul; e, em especial, colaboração com o Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, que cedeu uma série moléculas sintéticas e comerciais, pertencente à uma biblioteca de compostos de seu grupo de pesquisa, para a realização de ensaios de inibição enzimática.

As medidas de atividade foram realizadas de forma indireta, através do monitoramento da redução do agente colorimétrico DCIP, em um comprimento de onda de 610 nm, uma vez que a grande maioria dos compostos selecionados absorviam fortemente próximo ao comprimento de onda de monitoração da formação de orotato (300 nm).

Os experimentos foram realizados em um leitor de microplacas, com a adição de 200 μ L de um tampão contendo 50 mM tris pH 8,15, 150 mM cloreto de potássio, 0,1 % triton X-100, 500 μ M de DHO, 100 μ M de coenzima Q_0 e concentrações variadas de inibidor (partindo de 500 μ M e realizando diluições seriadas até atingir uma concentração onde não se observava inibição).

A reação foi iniciada com a adição de 5 μ L da enzima *SmDHODH* ou da enzima *HsDHODH*, de forma que a concentração final em solução consistiu em 157 nM para a *SmDHODH* e 61 nM para a enzima *HsDHODH*.

O curva controle foi obtida com a adição de 5 μ L de proteína em 200 μ L de tampão de atividade, sem a presença de inibidores. A taxa de redução do agente DCIP foi determinada por um período de 60 segundos, com leitura a cada 4 segundos. As medidas foram realizadas em triplicata, para cada concentração e composto testado. Os experimentos foram realizados em um leitor de microplacas, modelo SpectraMax Plus 384, da Molecular Devices.

Como a redução do DCIP é considerada estequiometricamente equivalente à oxidação de DHO, calculou-se a formação do produto em função do tempo e, conseqüentemente, a velocidade média de reação (V_i) para as diferentes concentrações dos inibidores testados. A velocidade média

de reação obtida na ausência do inibidor, denominada V_r , corresponde à velocidade de reação em que há 100% de atividade enzimática. A porcentagem de inibição (% inibição) foi determinada utilizando a fórmula: % inibição = $100 - (100 V_i/V_r)$.

O valor de IC₅₀ foi determinado a partir da construção do gráfico de porcentagem de inibição *versus* logaritmo da concentração de inibidor. Uma curva do tipo sigmoidal foi fitada através do ajuste dos dados à **equação 2**:

$$y = \frac{A1-A2}{1+\exp\left(\frac{x-x_0}{dx}\right)} + A2 \quad , \quad (2)$$

em que A1 corresponde ao valor mínimo de inibição, A2 corresponde ao valor máximo de inibição, e x_0 corresponde ao ponto de inflexão e corresponde ao log da concentração de inibidor responsável por 50% da perda de atividade enzimática (IC₅₀).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Subclonagem e expressão das enzimas

4.1.1 *SmDHODH*

A construção desenvolvida em nosso laboratório, inicialmente clonado em pTZ57R/T e subclonado em pETsumo, consistia no vetor de expressão correspondente ao gene que codifica a enzima *SmDHODH*. Nesta construção, o gene que codifica a enzima *SmDHODH* foi modificado, através da remoção dos primeiros 22 códons, de forma a produzir a proteína de interesse sem o domínio relativo ao peptídeo sinal para endereçamento à mitocôndria. Esse peptídeo foi removido de forma a favorecer o enovelamento e a estabilidade da proteína a ser produzida no sistema de expressão heterólogo em *E. coli*. O produto proteico produzido a partir desta construção apresenta 357 resíduos de aminoácidos e peso molecular predito de 38908,4 Da^[45].

O sequenciamento da construção previamente obtida indicou a presença de uma mutação não silenciosa no resíduo de aminoácido 146, o que levou à necessidade de retroceder, e buscar por diferentes construções ainda no vetor de subclonagem pTZ57R/T, sem a presença de mutações.

Uma nova construção de *SmDHODH* em pTZ57R/T sem mutação foi identificada, e forneceu o fragmento para ligação em pETsumo. A cepa de *E. coli* DH5 α (Invitrogen®) foi transformada com o produto final da reação de ligação e a presença do inserto foi confirmado a partir de reações de PCR para as colônias obtidas (**Figura 13a**). Os clones positivos foram confirmados por reação de dupla digestão (**Figura 13b**) e submetidos a sequenciamento de DNA.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose **a.** das amostras de PCR de colônia mostrando os clones positivos (em vermelho) da cepa de *E. coli* DH5 α . **b.** Gel de agarose da reação de digestão da enzima *SmDHODH* (1074pb) em pET-sumo (5639pb).

Os primeiros ensaios de expressão foram realizados na cepa de *E. coli* BL21(DE3) em meio de cultura LB (Luria-Bertani®), onde parâmetros como temperatura, concentração de agente indutor e

tempo de indução foram variados. No entanto, dentro das condições testadas, o rendimento proteico se mostrou bastante baixo e a proteína instável. Foram então avaliados diferentes parâmetros que pudessem explicar os insucessos na solubilidade e estabilidade da proteína de interesse.

Dentre esses parâmetros, foram realizadas análises com relação ao possível uso de códons utilizados pelo *Schistosoma mansoni*, mas considerados raros para *E.coli*, isto é, códons que requerem o uso de tRNAs que não se encontram em abundância em *E.coli* (códons raros). A presença desses códons raros poderia explicar o baixo rendimento obtido, além de também poderem levar a erros de tradução da proteína, como por exemplo a substituição de aminoácidos, a troca de fase de leitura em que os nucleotídeos podem ser eliminados ou inseridos, ou mesmo a terminação prematura da tradução. Os códons AGG/AGA/CGA, AUA, CUA e CCC, são exemplos de códons encontrados em baixa frequência em *E. coli* e que geralmente ocasionam estes erros^[62,63].

De acordo com o programa Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>), 40 dos 380 códons presentes na proteína são considerados raros para a *E. coli*, ou seja, aproximadamente 10,5%, inclusive com a presença de sequências consecutivas destes códons na proteína.

Desta forma, na tentativa de favorecer e aumentar a cinética da tradução substituímos o sistema de expressão para a cepa BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL, a qual apresenta tRNA para: argU (AGA, AGG), ileY (AUA), leuW (CUA).

Outra preocupação para a otimização dos parâmetros utilizados durante os experimentos de expressão se baseou na tentativa de maximizar a produção de FMN em *E.coli*. O FMN, utilizado como cofator em DHODH, se encontra no interior da estrutura da proteína^[64] e a sua ligação é parte integrante do processo de enovelamento da *SmDHODH*. Uma dificuldade na biossíntese de FMN em *E.coli* poderia levar à produção de proteína deficiente em FMN, o que poderia não somente ser responsável por uma população de *SmDHODH* inativa, assim como estruturalmente instável. Assim decidimos utilizar um meio de cultura rico, suplementado com extrato de levedura e triptona, visando assim uma maior produção e incorporação desse cofator. Para confirmar a incorporação do FMN, foi realizada uma varredura no espectro visível (400 – 700 nm), onde a presença de um pico de absorbância em 456 nm confirma a presença do FMN na enzima^[65].

As alterações realizadas no protocolo original resultaram em um aumento significativo nos níveis de expressão proteica, bem como contribuíram para o aumento da estabilidade e rendimento após o processo de purificação. Desta forma, o protocolo padronizado para expressar a *SmDHODH* consiste na utilização de 100 µM de IPTG, a 18°C, por 24 horas, em meio de cultura rico.

4.1.2 HsDHODH

A enzima HsDHODH foi subclonada em nosso laboratório pelo aluno de Doutorado Ricardo Augusto Pereira de Pádua, sem os primeiros 28 resíduos da sequência que codifica o gene, também com o objetivo de maximizar as chances de sucesso no enovelamento e de estabilidade proteica. Sua expressão foi realizada nos mesmos moldes da enzima de *Schistosoma mansoni*, utilizando a cepa BL21-CodonPlus®(DE3)-RIL, com 100 µM de IPTG, a 18°C, por 24 horas, em meio de cultura rico.

4.2 Purificação das enzimas

4.2.1 SmDHODH

Desde o início deste projeto abordamos inúmeras estratégias para purificação da proteína SmDHODH na tentativa de obter proteína pura, estável e com rendimento satisfatório, inclusive com a associação entre a cromatografia por afinidade e outros métodos cromatográficos, como a interação hidrofóbica, troca iônica e filtração em gel. Outras tentativas como a adição de sal, de detergente, de agente redutor e de glicerol também foram realizadas. No entanto abordaremos apenas o protocolo que apresentou maior rendimento e estabilidade proteica.

No início dos nossos experimentos observávamos uma forte tendência à formação de agregados quando a fração solúvel obtida após a lise celular era aplicada na resina previamente empacotada. Esses agregados se concentravam na fração superior da resina e prejudicavam não somente o fluxo da purificação, como também o rendimento proteico.

Para minimizar estes efeitos de agregação foram variados parâmetros como concentração de sal, concentração de detergente e tipo de detergente. Ainda, cogitamos a hipótese de que este efeito de agregação poderia ser consequência de um aumento da concentração local, ocasionado possivelmente pela interação da proteína na resina (principalmente na região superior), que também poderia favorecer interações entre a cauda de histidina com proteínas vizinhas, ou até mesmo a interação entre as regiões hidrofóbicas da proteína. Decidimos então dividir a fração solúvel e homogeneizar com a resina em diferentes etapas fora da coluna.

Em adição, partindo da observação que a proteína SmDHODH possui um número bastante superior de cisteínas, quando comparada com as proteínas homólogas da mesma classe, esses resíduos poderiam ser suscetíveis à formação de ligações dissulfeto inter ou intramoleculares indesejáveis, podendo interferir na estabilidade e solubilidade da enzima.

Outra dificuldade observada foi a presença de bandas de contaminantes que apareciam após a purificação (**Figura 14**). Para caracterizar um dos contaminantes, foi realizado o sequenciamento de aminoácidos N-terminal, através da transferência direta da banda observada no gel para a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), o que permitiu a identificação do contaminante.

Tratava-se de um fragmento da *SmdHODH*, sugerindo que a proteína se mostra susceptível ao ataque proteolítico.

Outra observação importante era a presença de um contaminante de tamanho similar à proteína de fusão sumo, que aparecia mesmo antes da adição da ULP1 (**Figura 14**). Esse fragmento também foi caracterizado por sequenciamento de aminoácidos N-terminal como um fragmento da proteína sumo. Este resultado, embora inesperado, sugere que um dos problemas associados ao baixo rendimento estaria também relacionado à perda da cauda antes da adição da ULP1. Para minimizar esse efeito, foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases na etapa de lise, e nossos resultados mostraram que a adição do coquetel foi capaz de reduzir estes efeitos de ataque proteolítico.

Figura 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% mostrando a presença de contaminantes após a purificação da *SmdHODH*. A seta rosa mostra a banda referente ao fragmento de *SmdHODH* e a seta verde mostra a banda referente à sumo. **1.** Marcador de peso molecular (GE Healthcare). **2 a 7.** Proteína *SmdHODH* eluindo em torno de 38,9 kDa, na presença de contaminantes.

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) mostra o perfil de eluição da proteína durante a purificação, sob as condições já otimizadas (**Figura 15**). A última etapa cromatográfica de afinidade permitiu a eluição da proteína com elevada pureza. A sumo e a cauda de histidina ficam retidas na coluna e são eluídas na presença do tampão A acrescido de 500 mM de imidazol.

Com relação aos componentes presentes nos tampões de purificação, notamos ser determinante a presença uma quantidade significativa de cloreto de sódio (600 mM), do detergente triton X-100 (1 % na lise e 0,15 % nas outras etapas de purificação) e de glicerol (10 %). Estes agentes favorecem a estabilidade e evitam a precipitação da proteína.

Figura 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% mostrando as etapas de purificação da proteína *SmDHODH*. **M:** Marcador de peso molecular (GE Healthcare); **1:** Fração solúvel; **2:** Efluente; **3:** Lavagem da coluna com o tampão A contendo 10 mM de imidazol; **4:** Lavagem da coluna com o tampão A contendo 25 mM de imidazol; **5:** Eluição da proteína após a primeira etapa de cromatografia por afinidade, em um tampão A contendo 500mM de imidazol; **6:** Eluição da proteína após a etapa de exclusão molecular; **7:** Eluição da *SmDHODH* (**A**) após a etapa de clivagem pela ULP1, no tampão A. Seu tamanho esperado é de 38,9 kDa; **8:** Eluição da ULP1 (**B**), bem como da cauda de histidina e da sumo (**C**), na presença do tampão A acrescido de 500 mM de imidazol.

O rendimento mostrou-se satisfatório: obtivemos em média o equivalente a 40 mg de proteína por litro de meio de cultura. A proteína apresenta coloração bem amarela devido à presença do cofator FMN incorporado à estrutura (**Figura 16**).

Figura 16. *SmDHODH* no concentrador, durante a diálise (esquerda), e após concentrar (direita).

Para a realização dos ensaios de atividade enzimática com variação de pH e dos ensaios de cinética através da monitorização da formação de orotato, foi necessário realizar a substituição do detergente triton X-100, que absorve no comprimento de onda de realização destes ensaios (300 nm), pelo detergente thesit. A purificação não mostrou alterações significativas, e a proteína permaneceu estável.

4.2.2 HsDHODH

A purificação da proteína *HsDHODH* seguiu os mesmos moldes da purificação estabelecida para a *SmDHODH*. A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% na presença do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) mostra o perfil de eluição da proteína durante a purificação (**Figura 17**). A última etapa cromatográfica de afinidade permitiu a eluição da proteína com elevada pureza, assim como a *SmDHODH*.

Figura 17. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% mostrando as etapas de purificação da proteína *HsDHODH*. **M:** Marcador de peso molecular (GE Healthcare); **1:** Fração solúvel; **2:** Efluente; **3:** Lavagem da coluna com o tampão A contendo 10 mM de imidazol; **4:** Lavagem da coluna com o tampão A contendo 25 mM de imidazol; **5:** Eluição da proteína após a primeira etapa de cromatografia por afinidade, em um tampão A contendo 500mM de imidazol; **6:** Eluição da proteína após a etapa de exclusão molecular; **7:** Eluição da *HsDHODH* após a etapa de clivagem pela ULP1, no tampão A. Seu tamanho esperado é de 39,9 kDa; **8:** Eluição da ULP1, da cauda de histidina e da sumo, na presença do tampão A acrescido de 500 mM de imidazol.

Obtivemos em média o equivalente a 10 mg de proteína por litro de meio de cultura. A proteína também apresenta coloração bem amarela devido à presença do cofator FMN incorporado à estrutura e, quando purificada na presença do detergente thesit, mostrou-se estável.

4.3 Determinação do coeficiente de extinção molar das enzimas

Além do kit BCA, outro método utilizado para determinação das concentrações de *SmDHODH* e *HsDHODH* baseou-se na utilização do coeficiente extinção molar do grupo prostético flavina na região do 450 nm ($\epsilon_{FMN450\text{ nm}} = 12,25\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

Estes coeficientes foram determinados conforme descrito na seção 3.3.1. O pico de absorção máxima para a *SmDHODH* ocorre em $\lambda=456\text{ nm}$, enquanto que para a *HsDHODH* esse pico ocorre em $\lambda=454\text{ nm}$. Os coeficientes de extinção molar obtidos para as enzimas correspondem a $\epsilon_{SmDHODH456\text{ nm}} = 13,08\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{HsDHODH454\text{ nm}} = 14,26\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (**Figura 18**).

Os espectros de absorção na região do visível para ambas as proteínas demonstraram, após o aquecimento das amostras, o deslocamento do pico para $\lambda=450$ nm, pico de absorbância característico do cofator FMN livre em solução.

Figura 18. Espectros de absorção na região do visível das enzimas *SmDHODH* e *HsDHODH*, antes e após aquecimento das amostras.

4.4 Caracterização das enzimas *SmDHODH* e *HsDHODH*

4.4.1 Medidas de atividade enzimática em diferentes pHs

Com o objetivo de avaliar qual era a faixa de pH mais adequada para realizar os experimentos de cinética enzimática e os ensaios de inibição enzimática, medidas de atividade da *SmDHODH* e da *HsDHODH* foram realizadas na faixa de pH de 6,0 a 10,0.

Dois métodos foram utilizados para a realização destas medidas. No primeiro método, indireto, as medidas de atividade foram realizadas utilizando o reagente colorimétrico DCIP como aceptor final de elétrons, na presença e na ausência de coenzima Q_0 a 100 μ M, porém sempre na presença de 500 μ M de DHO (**Figuras 19 e 20**). No segundo método as medidas de atividade foram realizadas de forma direta, isto é, monitoramos a formação do produto da reação enzimática, o orotato, a 287 nm, na presença de 500 μ M de DHO (**Figura 21**).

O primeiro método permitiu avaliar qual o pH mais adequado para prosseguir com os ensaios de inibição enzimática, já que a grande maioria dos inibidores absorvem em um comprimento de onda próximo a 300 nm, ou seja, próximo do pico de absorção para o orotato. O segundo método permitiu avaliar o pH ótimo para realização dos ensaios de cinética.

Figura 19. Velocidade de formação de orotato para os diferentes pHs testados (monitoramento indireto da redução do DCIP, na presença de coenzima Q₀). Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0.

Figura 20. Velocidade de formação de orotato para os diferentes pHs testados (monitoramento indireto da redução do DCIP, na ausência de coenzima Q₀). Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0.

Figura 21. Velocidade de formação de orotato para os diferentes pHs testados (método direto). Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0.

A análise destes resultados merece uma discussão especial. A identificação do pH ótimo, além de determinar as melhores condições para a realização dos ensaios de caracterização cinética, também foi utilizada na busca de inibidores. Isto impõe alguns critérios que devem ser levados em consideração. Se por um lado a proteína deve estar ativa, o ensaio deve garantir que o pH apresente valor que minimize indesejáveis efeitos de protonação ou desprotonação tanto das moléculas do meio reacional quanto dos potenciais ligantes a serem testados.

A análise dos resultados mostrados na **figuras 19, 20 e 21** sugerem, sob todas as condições testadas, que o pH ótimo da reação enzimática está entre 8,0 e 8,5. No entanto, durante a realização dos experimentos de atividade através do método indireto, observamos a susceptibilidade do meio reacional com relação à variação de pH.

No experimento de atividade o DCIP é convertido a DCIPH₂, e esta conversão é monitorada a 610 nm através da perda de coloração azul. Observamos, contudo, que em pHs mais ácidos existe uma mudança na coloração azul do meio reacional para rosa ou roxo, indicando a presença da espécie DCIPH neste meio. Ainda, experimentos de atividade realizados por um tempo de reação mais longo sugere que em pHs mais básicos a reoxidação do DCIPH₂ a DCIP é favorecida. Observamos que este fenômeno é aparentemente mais intenso em tempos mais longos, mas não podemos descartar a hipótese de que para tempos menores de monitoramento da reação, esse fenômeno de reoxidação se combine com o sentido inverso da reação (DCIP → DCIPH₂), e os resultados, ainda que indicando um aumento da atividade em pHs próximo de 8 a 8,5, podem qualitativamente conter erros, por mensurar a resultante entre a combinação da conversão DCIP → DCIPH₂ com a reação no sentido inverso (DCIPH₂ → DCIP). Optamos, assim, por monitorar a reação em pH 8,15, isto porque além de apresentar comportamento satisfatório em termos de atividade enzimática, este corresponde ao pH da reação utilizado previamente em nosso laboratório para a realização de ensaios de inibição enzimática com a proteína homóloga humana.

Outro aspecto importante se refere às velocidades de formação de orotato para as proteínas em estudo. Observamos que as velocidades obtidas para a proteína humana são relativamente maiores em comparação com a DHODH de *Schistosoma*. Ainda, ao comparar os experimentos de atividade realizados (**Figura 22**), não notamos diferença em termos de velocidade de reação para os métodos direto e indireto (na presença de quinona). Apenas para o método indireto na ausência de quinona é que notamos menores velocidades de formação de produto. Embora esse resultado tenha se mostrado inesperado, sugere que o DCIP pode atuar como substrato da reação.

Figura 22. Comparação entre os ensaios de atividade realizados para as enzimas *SmDHODH* (esquerda) e *HsDHODH* (direita). **A.** Método direto para *SmDHODH*. **B.** Método indireto na presença de quinona para *SmDHODH*. **C.** Método indireto na ausência de quinona para *SmDHODH*. **D.** Método direto para *HsDHODH*. **E.** Método indireto na presença de quinona para *HsDHODH*. **F.** Método indireto na ausência de quinona para *HsDHODH*. Os tampões utilizados foram: MES pH 6,0; MES pH 6,5; Tris base pH 7,0; Tris base pH 7,5; Tris base pH 8,0; Tris base pH 8,15; Tris base pH 8,5; Tris base pH 9,0; Glicina pH 9,5; Glicina pH 10,0.

4.4.2 Caracterização cinética da *SmDHODH* e da *HsDHODH*

As DHODHs classe 2 catalisam a conversão do diidrorotato a orotato utilizando a quinona como agente oxidante. Os ensaios de cinética enzimática foram inicialmente realizados através da medida da redução do DCIP, que é estequiometricamente equivalente à oxidação de DHO à orotato^[60]. Entretanto, observou-se que o DCIP interfere na reação enzimática catalisada pela DHODH, impossibilitando o ajuste dos dados experimentais utilizando o modelo de cinética enzimática do tipo ping-pong utilizando este método. Para solucionar o problema, optamos por realizar os ensaios de cinética enzimática através da monitorização da formação de orotato, em pH 8,15 e a temperatura ambiente de 27 °C.

As curvas de velocidade pela concentração de DHO e de Q₀ mostraram um perfil michaeliano para as enzimas (**Figuras 23 e 24**). Foi realizado o ajuste destes dados à equação do Ping-Pong (**Figuras 25 e 26**) e foram obtidos os valores de K_{M DHO}, K_{M Q0} e k_{cat} para ambas as enzimas (**Tabela 4**).

Figura 23. Curvas de k_{obs} em função da variação da concentração de substrato obtidas para a enzima *SmDHODH*.

Figura 24. Curvas de k_{obs} em função da variação da concentração de DHO e de Q_0 obtidas para a enzima *HsDHODH*.

Figura 25. Gráfico 3D de k_{obs} em função da variação da concentração dos substratos DHO (μM) e Q_0 (μM) dentro da cinética do estado estacionário para a enzima *SmDHODH*. A curva construída com base nos dados experimentais (esquerda) pode ser comparada com base na curva teórica (direita) calculada, após o ajuste dos dados à equação do Ping-Pong.

Figura 26. Gráfico 3D de k_{obs} em função da variação da concentração dos substratos DHO (μM) e QO (μM) dentro da cinética do estado estacionário para a enzima *HsDHODH*. A curva construída com base nos dados experimentais (esquerda) pode ser comparada com base na curva teórica (direita) calculada, após o ajuste dos dados à equação do Ping-Pong.

Tabela 4. Parâmetros obtidos para a cinética de estado estacionário para as duas reações catalisadas pelas enzimas *SmdHODH* e *HsDHODH*.

Parâmetros catalíticos	<i>SmdHODH</i>	<i>HsDHODH</i>
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	27 ± 1	78 ± 4
$K_{\text{M DHO}} (\mu\text{M})$	174 ± 18	286 ± 31
$K_{\text{M QO}} (\mu\text{M})$	159 ± 18	354 ± 38

Os resultados obtidos sugerem que ambas as enzimas seguem o mecanismo Ping-Pong, de acordo com o que já foi descrito para as outras DHODHs^[42,66,67]. Além disso, o ajuste dos dados experimentais com o modelo de cinética enzimática mostrou-se bastante satisfatório.

Os valores de k_{cat} obtidos mostram que a enzima humana apresenta velocidade de reação aproximadamente três vezes maior que a enzima do parasito. Outra observação importante é que os valores de $K_{\text{M DHO}}$ e de $K_{\text{M QO}}$ são próximos quando analisamos as enzimas separadamente.

Inicialmente tentamos realizar nossos estudos de forma indireta, através da medida da redução do DCIP. Entretanto, não foi possível ajustar os dados obtidos em um modelo michaeliano. Isto pode ser explicado, uma vez que o DCIP interfere na segunda etapa da reação enzimática catalisada pela DHODH. Em outras palavras, esta molécula é capaz de atuar como aceptor de elétrons da reação enzimática. Ainda notamos que o excesso de quinona presente no meio reacional é capaz de reoxidar o DCIPH₂ a DCIP. Por outro lado, para concentrações de quinona maiores que a concentração de DCIP utilizado no meio reacional, não se tem DCIP suficiente para ser reduzido a DCIPH₂, o que impossibilita a realização deste ensaio para concentrações mais altas de quinona. Todos estes fatores nos levam a crer que o método indireto não é adequado para a realização de ensaios de cinética enzimática.

4.4.3 Avaliação do estado oligomérico e da estabilidade da SmDHODH

4.4.3.1 Cromatografia por exclusão molecular

Para a determinação do estado oligomérico da SmDHODH e avaliação da possível presença de agregados, foram realizados ensaios de cromatografia por exclusão molecular (filtração em gel) e espalhamento dinâmico de luz.

A coluna Superdex 200 (10/300) foi inicialmente calibrada a 280 nm utilizando marcadores moleculares de tamanhos conhecidos para a determinação da função que correlaciona massa molecular com volume de eluição (**Figura 27**).

Figura 27. Perfil de eluição dos marcadores moleculares obtidos com a calibração da coluna Superdex 200 (10/300) (GE®). **B.** Regressão linear para a determinação da função que correlaciona massa molecular com volume de eluição dos padrões aplicados na coluna Superdex 200 (10/300). Ln Mr = logaritmo neperiano da massa molecular. $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$, onde V_e é o volume de eluição, V_o é o volume de exclusão, e V_c é o volume da coluna.

O perfil de eluição da SmDHODH, monitorado a 450 nm em coluna Superdex 200 (10/300), está representado na **figura 28**. O cromatograma apresenta um pico majoritário com máximo de absorbância em 12,072 mL.

Figura 28. Perfil de eluição da *SmdHODH* em coluna Superdex 200 (10/300), equilibrada com tampão tris 50mM, cloreto de sódio 500 mM e 0,05% de triton X-100 em pH 8,5. O gel em SDS-PAGE representa as amostras referentes ao pico de absorção a 450 nm.

Embora tenhamos obtido um pico relativamente definido, os resultados obtidos sugerem que a enzima *SmdHODH* se apresenta na forma de um tetrâmero com peso molecular de 172,5 kDa. Este resultado é inesperado e pode estar associado a um possível estado de agregação da enzima de interesse, já que o esperado para esta proteína é a forma monomérica. Vale ressaltar que o monitoramento foi realizado a 450 nm, pois experimentos anteriores a 280 nm mostraram que o detergente triton interfere no perfil cromatográfico de eluição da enzima por absorver neste comprimento de onda. Como a substituição do detergente triton X-100 pelo thesit foi realizada mais recentemente, novos experimentos serão realizados a fim de checar se o resultado apresentado se reproduz.

4.4.3.2 Espalhamento dinâmico de luz

Além da filtração em gel, medidas de DLS correspondentes ao pico de absorbância foram realizadas para fornecer informações acerca do tamanho de partícula da *SmdHODH*. As medidas de tamanho de partícula da proteína utilizando a técnica de espalhamento dinâmico de luz foram feitas com variação do pH de 4 a 9 (**Figura 29**); e após submeter a proteína à cromatografia por exclusão molecular (**Figura 30**).

Figura 29. Perfil de variação de porcentagem de intensidade de espalhamento e de volume em função da distribuição de tamanho da proteína *SmdHODH* obtido através da técnica de espalhamento dinâmico de luz na presença de agentes tamponantes. Os tampões foram preparados com 50 mM do agente tamponante e 150 mM de cloreto de sódio. A concentração final da proteína é de 3mg/mL.

Figura 30. Perfil de variação de porcentagem de intensidade de espalhamento e de volume em função da distribuição de tamanho da proteína *SmdHODH* obtido através da técnica de espalhamento dinâmico de luz após a realização da cromatografia por exclusão molecular.

Os resultados em função do pH mostraram que, embora obtivemos duas populações de proteína, a contribuição do primeiro pico, que apresenta raio médio entre 41 e 67 Å varia de 93,6 a 96,6 % para os diferentes pHs testados. A segunda população, que apresenta raio entre 125 e 253 Å, tem contribuição menor de 3,4 a 6,4 %. Esta formação, ainda que pequena em porcentagem de agregados maiores, pode ser consequência da forma de manipulação da proteína que foi inicialmente concentrada a 30 mg/mL no tampão de purificação e posteriormente realizamos uma diluição de 10 vezes no tampão em que a medida foi realizada. Considerando já nossa experiência nos experimentos de purificação onde a proteína mostra uma forte tendência a agregação com o aumento da concentração, acreditamos que esses agregados maiores podem ser consequência da necessidade de concentrar a amostra previamente à diluição no pH de interesse.

Apesar do aparecimento desta segunda população, o pico majoritário, nos permitiu tirar informações acerca da estabilidade da proteína em função do pH e de acordo com os experimentos de cinética enzimática, embora não haja uma mudança significativa no perfil da distribuição de raio em função da intensidade, sugere que nas condições testadas os pHs no intervalo 7,5-8,0 apresentam uma população menos polidispersa.

Alem disso, quando acrescentamos a etapa de cromatografia por exclusão molecular, temos apenas um pico monodisperso de raio médio de 45 ± 8 Å e massa molecular estimada em $111 \pm 21,6$ kDa. Medidas de tamanho da proteína DHODH humana, que apresenta estrutura resolvida, no programa Pymol, mostra que esta apresenta raio médio entre 22 e 25 Å. Poderíamos sugerir que, apesar de monodisperso e único, este pico não se refere a um monômero, conforme o esperado para enzimas desta classe das DHODHs. Além disso, o limite superior estimado para a massa molecular é próximo da massa esperada para um tetrâmero da *SmDHODH* (~155,6 kDa), o que sugere que o resultado de espalhamento dinâmico de luz confirma o resultado obtido na gel filtração. Como não existe nenhuma evidência estrutural, além de ser um resultado que se encontra em desacordo com as características descritas quanto ao grau de oligomerização descrito para as DHODHs de classe 2 (enzimas humana, de *Plasmodium sp*, de *E. coli*, dentre outras)^[44], ainda não podemos afirmar que a proteína *SmDHODH* apresenta um novo perfil de oligomerização, diferente dos membros desta classe. Estudos estruturais, assim como novos ensaios de caracterização do estado oligomérico precisarão ser realizados para demonstrar a efetiva existência desse possível tetrâmetro e sua relação com a função catalítica e celular da *SmDHODH* em *Schistosoma mansoni*.

4.4.4 Ensaios de inibição enzimática

4.4.4.1 *SmDHODH*

Os ensaios de inibição enzimática foram realizados para a DHODH de *Schistosoma* na presença de diversos compostos sintéticos, de forma indireta, através do monitoramento da redução do DCIP, em um comprimento de onda de 610 nm, uma vez que a maioria dos compostos absorve no comprimento de onda de 300 nm e não é possível monitorar a formação de orotato.

Partindo de uma biblioteca de aproximadamente 200 compostos, ensaios preliminares na presença de concentrações mais altas de ligantes permitiram selecionar os compostos que eram capazes de inibir pelo menos parcialmente a reação enzimática. Os resultados obtidos estão apresentados na **Tabela 5**.

Posteriormente, experimentos variando a concentração dos compostos selecionados foram realizados para todos os compostos apresentados na **tabela 5** com o objetivo de obter a concentração de composto responsável pela inibição de 50% da atividade enzimática (IC50).

Tabela 5. Valores de porcentagem de inibição da enzima *SmdHODH* frente a alguns compostos testados em ensaios preliminares.

Código / nome da molécula	Concentração (μM)	Inibição (%)	Erro
FE-3 / benzoquinona	500	101,3	0,8
Atovaquona / trans-2-[4-(4-clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftalenodiona	500	99	5
QHM-09 / 2-hidroxi-3-(fenilamino)naftaleno-1,4-diona	500	98,36	0,05
FE-31 / 2-metilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	500	96,4	0,3
RBMLP-42 / 2-((3-(3-metilbut-2-en-1-il)-1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il)oxi)acetonitrila	500	96	0,2
Brequinar / ácido 6-fluoro-2-(2'-fluorobifenil-4-il)-3-metilquinolino-4-carboxílico	500	95,6	0,4
QHM-12 / 2-((2,6-dimetilfenil)amino)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona	500	94	2
A771726 / 2-ciano-3-hidroxi-N-[4-(trifluorometil)fenil]-2-butenamida	500	93,9	0,2
Tosil lapachol / 3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il-4-metilbenzenosulfonato	500	92,1	0,2
FE-10 / 2-hidroxi-naftaleno-1,4-diona	500	90,3	0,3
FE-32 / 2-(tert-butil)ciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	500	79,4	0,5
QXONT / 2-aminonafto[1,2- <i>d</i>]tiazol-5-ol	500	68,4	0,6
QXOFUR / 3,3-dimetil-2-metileno-2,3-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona	500	59,0	1
RBMLP-41 / 2-((1,4-dioxo-1,4-diidronaftalen-2-il)oxi)acetonitrila	500	46,0	1
FE-20 / 4,5-dicloro-3,6-dioxociclohexa-1,4-dieno-1,2-dicarbonitrila	500	38	1
α-Lapachol / 2,2-dimetil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo(g)cromeno-5,10-diona	500	31,9	0,8
LCPSP-002 / 6,7-dimetil-2-tioxo-2,3-diidro-4(1 <i>H</i>)-pteridinona	500	26	2
FE-35 / 2,5-difenil-(1,4)benzoquinona	500	14	3
LCPSP-3027 / 6-(butil-sulfanil)-1,2,4-triazino-3,5-diol	500	13	3
MPO / 2-mercaptopiridina N-óxido	500	9	2
FE-25 / 2,5-di-tert-butilciclohexa-2,5-dieno-1,4-diona	500	6	1
GB-104 / bis-(2,4,5-trimetoxifenil)metano	500	5	1
LBC-01 / 2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona	250	100,0	0,2
QHM-23 / 2-hidroxi-3-(4-(4-nitrofenil)piperazin-1-il)naftaleno-1,4-diona	250	98,2	0,01
QHM-11 / 2-((2-clorofenil)amino)-3-hidroxi-naftaleno-1,4-diona	250	98,0	0,6
QHM-10 / 2-hidroxi-3-((4-metoxifenil)amino)naftaleno-1,4-diona	250	96,2	0,2
RBMLP-35 / 2-cloro-3-(metilamino)naftaleno-1,4-diona	250	69,2	1
QXOMT / 2-amino-4-metilnafto[1,2- <i>d</i>]tiazol-5-ol	250	69,2	0,3
RBMLP-16 / 2-cloronaftaleno-1,4-diona	250	54,4	1
Lapachol reduzido / 2-hidroxi-3-isopentilnaftaleno-1,4-diona	125	98	1
LBC-02 / (<i>E</i>)-2-hidroxi-3-(3-metilbut-2-en-1-il)naftaleno-1,4-diona	62,5	97,1	0,2

Dos compostos acima apresentados, não foi possível obter os valores de IC₅₀ para os compostos que apresentaram inibição abaixo de 60% para a concentração de 500 μM, pois além de apresentarem baixa capacidade inibitória, não eram solúveis a concentrações maiores que 500 μM

na solução tampão. Para o composto QXOMT, em particular, não foi possível obter o IC₅₀ porque este composto é capaz de reduzir o DCIP na ausência da enzima, invalidando o ensaio. Para o restante dos compostos, traçamos gráficos de logaritmo da concentração de inibidor versus porcentagem de inibição para cada molécula selecionada e apresentamos os dados a seguir (**Figuras 31, 32, 33 e 34**).

Figura 31. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC₅₀, para os experimentos realizados com a enzima *SmdHODH*.

Figura 32. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC50, para os experimentos realizados com a enzima *SmDHODH*.

Figura 33. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC50, para os experimentos realizados com a enzima *SmDHODH*.

Figura 34. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC50, para os experimentos realizados com a enzima *SmDHODH*.

Como pudemos observar na tabela 5, muitas moléculas se mostraram capazes de inibir a enzima *SmDHODH*. Dentre estas, as que apresentaram menor IC50, isto é, as mais efetivas, são atovaquona, QHM-23, QHM-11, lapachol reduzido e LBC-01, em que uma concentração na escala de nanomolar já foi suficiente para inibir 50% da atividade enzimática. Ainda é importante salientar que o fármaco atovaquona, utilizado atualmente para o tratamento da malária, se mostrou eficiente na inibição da enzima de *Schistosoma*, o que aponta a possibilidade de futura realização de ensaios pré-clínicos com este composto, para validá-lo também para o tratamento da esquistossomose.

Testamos também o composto teriflunomida, ou A771726, que corresponde ao metabólito ativo do pró-fármaco leflunomida, utilizado atualmente para o tratamento de artrite reumatoide, e o composto brequinar, que chegou a passar por testes clínicos para ser validado como antineoplásico mas por motivos de alta toxicidade não foi aprovado^[27,28,29,30,31]. Estes compostos apresentaram valores de IC50 de $50,12 \pm 0,08 \mu\text{M}$ e $19,95 \pm 0,09 \mu\text{M}$, respectivamente. Sendo assim, não se mostraram eficientes na inibição da enzima *SmDHODH*.

Outro aspecto que merece atenção é o fato de que a maioria das estruturas dos compostos que apresentaram alguma porcentagem de inibição são naftoquinonas. Tais compostos foram sintetizados e/ou obtidos de uma biblioteca de compostos elaborados pelo Prof. Dr. Flávio da Silva Emery e serão utilizados posteriormente em testes pré-clínicos com animais de experimentação.

4.4.4.2 *HsDHODH*

Para avaliar a seletividade na inibição provocada pelos compostos que apresentaram IC50 menor que $51 \mu\text{M}$, foram realizados ensaios frente à enzima humana. Estes ensaios são extremamente importantes, uma vez que se deseja a inibição seletiva da enzima do parasito. Os gráficos de logaritmo da concentração de inibidor versus porcentagem de inibição para cada

molécula selecionada foram plotados (**Figuras 35 e 36**) e os valores de IC₅₀ obtidos para ambas as enzimas foram compilados na **tabela 6** para uma discussão mais detalhada.

Figura 35. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC₅₀, para os experimentos realizados com a enzima HsDHODH.

Figura 36. Gráficos da porcentagem de inibição em função do logaritmo da concentração de inibidor, juntamente com os parâmetros da curva utilizados para o cálculo dos valores de IC50, para os experimentos realizados com a enzima *HsDHODH*.

Tabela 6. Valores de IC₅₀, em μM ou em nM, calculados para as enzimas *SmDHODH* e *HsDHODH* na presença dos compostos testados.

Composto	<i>SmDHODH</i>		<i>HsDHODH</i>	
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (nM)
FE-32	794 $\pm$ 3			
RBMLP-16	144,5 $\pm$ 0,3			
RBMLP-35	79,4 $\pm$ 0,4			
FE-31	56,23 $\pm$ 0,04			
A771726	50,12 $\pm$ 0,08			309,0 $\pm$ 0,2
Tosil lapachol	31,62 $\pm$ 0,03		7,9 $\pm$ 0,1	
FE-10	28,8 $\pm$ 0,1		***	
Brequinar	19,95 $\pm$ 0,09			37,2 $\pm$ 0,1
QXONT	14,13 $\pm$ 0,08		*	
QHM-12	9,77 $\pm$ 0,07		10,0 $\pm$ 0,2	
FE-03	8,71 $\pm$ 0,04		33,9 $\pm$ 0,1	
QHM-10	4,68 $\pm$ 0,06		***	
RBMLP-42	2,45 $\pm$ 0,03		***	
QHM-09	2,09 $\pm$ 0,02		2,63 $\pm$ 0,09	
LBC-02	1,230 $\pm$ 0,008		10,0 $\pm$ 0,09	
Atovaquona		436,5 $\pm$ 0,1	2,69 $\pm$ 0,03	
QHM-23		371,5 $\pm$ 0,2	***	
QHM-11		77,6 $\pm$ 0,2		812,8 $\pm$ 0,2
Lapachol reduzido		22,9 $\pm$ 0,3		707,9 $\pm$ 0,1
LBC-01		19,1 $\pm$ 0,1		100,0 $\pm$ 0,1

Os compostos que apresentam maior seletividade para a enzima humana estão grifados em roxo e os compostos mais seletivos para a enzima do parasito estão grifados em verde.* O composto QXONT foi testado para a enzima humana, no entanto sua inibição é baixa e não permite a obtenção do parâmetro IC₅₀. *** correspondem aos compostos que não puderam ser testados para a enzima humana.

Os resultados obtidos são bastante promissores. Apesar de compostos como QHM-09 e QHM-12 apresentarem valores muito semelhantes de IC₅₀ para ambas as enzimas, o que não confere seletividade, outros compostos foram capazes de inibir seletivamente ou a enzima do parasito (QXONT, FE-03, LBC-02, atovaquona, QHM-11, lapachol reduzido e LBC-01) ou a enzima humana (A771726, brequinar e tosil lapachol). O composto lapachol reduzido, por exemplo, apresenta IC₅₀ aproximadamente 31 vezes maior para a enzima do parasito. Essa diferença pode ser explorada futuramente no sentido de aumentar a seletividade na inibição da DHODH de *Schistosoma mansoni*.

4.4.4.3 Análise da relação entre a estrutura dos análogos de quinona e a capacidade de inibição da enzima SmDHODH

Baseado nos resultados apresentados na **tabela 6**, foi realizada uma análise da relação entre a estrutura dos análogos de quinona e sua capacidade inibitória. Para isto, os compostos apresentados foram divididos em cinco grupos: anilina-naftoquinonas (QHM-09, QHM-10, QHM-11, QHM-12, QHM-23), lapachol e derivados (LBC-01, LBC-02, tosil lapachol, α -lapachol e RBMLP-42), naftoquinonas (RBMLP-16, RBMLP-35 e FE-10), benzoquinonas comerciais (FE-03, FE-31 e FE-32), e tiazóis (QXONT) (**Figura 37**).

Figura 37. Compostos análogos à quinona testados. **A.** Anilina-naftoquinonas; **B.** Tiazol; **C.** Lapachol e derivados; **D.** Benzoquinonas comerciais; **E.** Naftoquinonas; **F.** Atovaquona.

O composto QHM-11 ($IC_{50} = 77,6 \pm 0,2$ nM), pertencente ao conjunto das 1,3-anilino-1,4-naftoquinonas (**Figura 37.A**), quando comparado ao fármaco atovaquona, apresenta uma diferença com relação ao grupo espaçador, situado entre o anel quinoidal e o anel aromático. Seu grupo espaçador consiste em um heteroátomo, em comparação com o ciclohexano presente na atovaquona. A redução do tamanho deste grupamento, aliado à capacidade do grupo espaçador em doar elétrons para o anel quinoidal, sugere se tratar de um fator importante para a inibição da atividade da enzima *SmDHODH*. Já o composto QHM-23 ($IC_{50} = 371,5 \pm 0,2$ nM) apresenta o mesmo padrão estrutural que o composto atovaquona, com a troca do ciclohexano do fármaco por um anel piperazina, e com a troca do cloro do fármaco por um grupamento nitro no inibidor. Estas mudanças estruturais não forneceram diferenças significativas na capacidade de inibição enzimática em comparação à atovaquona.

A molécula QHM-10 ($IC_{50} = 4,68 \pm 0,06$ μ M) apresenta uma metoxila, grupamento capaz de doar mais elétrons para o anel aromático que o cloro presente na atovaquona. Portanto o fator eletrônico, mais uma vez, mostra-se importante para a inibição enzimática. Esta molécula apresenta anel aromático mais rico em elétrons, em comparação aos anéis presente nos compostos QHM-11 e QHM-23, o que pode ter contribuído para um IC_{50} maior para QHM-10. O composto QHM-09 ($IC_{50} = 2,09 \pm 0,02$ μ M) difere de QHM-11 apenas pela ausência do grupamento cloro. QHM-12 ($IC_{50} = 9,77 \pm 0,07$ μ M) apresenta, assim como QHM-10, anel aromático com substituintes ricos em elétrons, afetando desta forma o potencial de oxirredução e, conseqüentemente, reduzindo sua efetividade.

Com relação ao composto QXONT (**Figura 37.B**), um tiazol, é importante salientar que, durante os experimentos de inibição enzimática, observava-se a redução do DCIP no tampão de atividade mesmo na ausência da enzima e, portanto, a oxidação do QXONT. Este fato levanta a dúvida sobre qual composto estaria inibindo a enzima *SmDHODH*, o tiazol na forma apresentada ou a forma oxidada. Para avaliar esta questão será realizada a síntese deste composto em sua forma oxidada e novos ensaios de inibição serão realizados.

O grupo do lapachol e seus derivados (**Figura 37.C**) contém o composto RBMLP-42 ($IC_{50} = 2,45 \pm 0,03$ μ M), que é semelhante ao tosil lapachol ($IC_{50} = 31,62 \pm 0,03$ μ M) por apresentar a hidroxila protegida, entretanto apresenta o grupamento $-CH_2CN$, que promove redução na atividade, o que indica que o aumento do tamanho do composto aparentemente é responsável pela diminuição da inibição. Além disso, a hidroxila livre parece ser importante para o aumento da atividade inibitória. O isolapachol (LBC-02) difere do lapachol (LBC-01) apenas pela posição da dupla ligação da cadeia lateral, neste caso, conjugada com o anel quinoidal. A consequência disso é que a região da cadeia lateral fica mais deficiente em elétrons para o LBC-02. Com relação aos compostos lapachol e lapachol reduzido, estes não apresentam ressonância da cadeia lateral, que é hidrofóbica, e,

portanto, muito mais semelhante à cadeia presente na ubiquinona. Esta análise mostra a importância da interação hidrofóbica e do aumento da lipofilicidade em um bom inibidor. Estudos realizados com os compostos lapachol e isolapachol já demonstraram sua atividade cercaricida^[70].

Dos compostos que apresentaram maior potencial de inibição (QHM-09, LBC-02, atovaquona, QHM-23, QHM-11, lapachol reduzido e LBC-01), notou-se que estes apresentam uma característica em comum: a presença da hidroxila no anel quinoidal. Isto indica que a função hidroxinaftoquinona parece ser importante para a inibição da *SmDHODH*. Porém, a presença desta função sem grupamentos adicionais na posição 3, não garante a inibição. Tanto é que, dentre os compostos pertencentes ao grupo das naftoquinonas (**Figura 37.E**), FE-10, uma hidroxinaftoquinona natural (lausona), apresentou $IC_{50} = 28,8 \pm 0,1 \mu M$. Isso gera a hipótese de que a adição de Michael ao anel quinoidal, característica comum a este conjunto de estruturas, não está envolvida no mecanismo de inibição desta enzima. O valor de IC_{50} de FE-10 é um valor alto em comparação aos obtidos para outros compostos. Isto confirma a hipótese de que é necessário a presença de um substituinte no anel quinoidal.

Como perspectiva futura pretende-se realizar: a síntese de novas moléculas, em colaboração com o Prof. Dr. Flávio da Silva Emery, visando aumentar a seletividade para a enzima do parasito; estudos para determinação do mecanismo de inibição; e, por fim, ensaios pré-clínicos com animais de experimentação, com objetivo de validar moléculas para o tratamento da esquistossomose.

5 CONCLUSÕES

O presente projeto visou os estudos preliminares de caracterização bioquímica e biofísica da enzimas *SmDHODH* e *HsDHODH*, assim como a busca de ligantes, como uma primeira etapa no sentido de avaliar o potencial da inibição seletiva da via de biossíntese de pirimidinas como estratégia terapêutica no combate a esquistossomose.

O início do trabalho focou o desenvolvimento de um protocolo de expressão e purificação das enzimas envolvidas neste projeto, *SmDHODH* e sua homóloga humana *HsDHODH*, que revelaram a importância do uso da cepa BL21-CodonPlus® e da suplementação do meio de cultura, para melhorar o rendimento e a estabilidade das enzimas de interesse. Já na purificação foi observado a importância do uso do coquetel inibidor de proteases, do glicerol e do detergente, auxiliando tanto na solubilidade quanto na estabilidade da enzima. A purificação apresentou rendimento satisfatório e a fração protéica apresenta pureza considerável.

Estudos de espalhamento dinâmico de luz, associados à cromatografia de exclusão molecular, realizados para a *SmDHODH*, sugerem que a enzima tende a formar agregados, porém a cromatografia de exclusão molecular mostrou-se eficiente em separar apenas uma população, de diâmetro aproximado de 90 Å.

O pH ótimo da reação para ambas as enzimas se encontra na faixa entre 8,0 e 8,5. Desta forma, o pH 8,15 foi o pH de escolha para a realização dos experimentos de cinética e de inibição enzimática. Os resultados cinéticos obtidos sugerem que a *SmDHODH* e a *HsDHODH* seguem o mecanismo Ping-Pong, de acordo com o que já foi descrito para as outras DHODHs, com os seguintes valores de K_M e k_{cat} : $K_{DHO} = 174 \pm 18 \mu M$; $K_{QO} = 159 \pm 18 \mu M$; e $k_{cat} = 27 \pm 1 s^{-1}$ para a *SmDHODH* e $K_{DHO} = 286 \pm 31 \mu M$; $K_{QO} = 354 \pm 38 \mu M$; e $k_{cat} = 78 \pm 4 s^{-1}$ para a *HsDHODH*.

Os ensaios de inibição enzimática na presença de ligantes de origem sintética e natural permitiram a identificação inibidores seletivos tanto para a enzima do parasito quanto para a enzima humana. Foram identificados compostos químicos com potencial inibitório na faixa de $794 \pm 3 \mu M$ a $19,1 \pm 0,1 nM$ para a *SmDHODH* e de $33,9 \pm 0,1 \mu M$ a $37,2 \pm 0,1 nM$ para a *HsDHODH*. A síntese de moléculas análogas serão realizadas a fim de maximizar a seletividade dos inibidores contra a enzima do parasito.

Os resultados deste trabalho aliado aos estudos estruturais em desenvolvimento pelo nosso laboratório serão utilizados não só para a completa caracterização da enzima, mas também para o futuro planejamento de ligantes específicos baseados na estrutura e função proteica, como uma importante ferramenta no combate à esquistossomose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. Ficha nº 115. Janeiro de 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>. Acesso em: 30 jun. 2014.
- [2] MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde**. Revista de Saúde Pública, v.44(1): p.200-202, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.org/pdf/rsp/v44n1/23.pdf>. Acesso em 25 mai. 2014.
- [3] BAKER, M. et al. Neglected Tropical Diseases 3 Mapping, monitoring, and surveillance of neglected tropical diseases: towards a policy framework. **Lancet**, v. 375, n. 9710, p. 231-238, 2010.
- [4] GYAPONG, J. et al. Neglected Tropical Diseases 2 Integration of control of neglected tropical diseases into health-care systems: challenges and opportunities. **Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 160-165, 2010.
- [5] LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Neglected Tropical Diseases 1 Programmes, partnerships, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 67-76, 2010.
- [6] STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R., TANNER, M., UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 411–425, 2006.
- [7] MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vigilância em Saúde: Dengue, Esquistossomose, Hanseníase, Malária, Tracoma e Tuberculose. Série A. Normas e Manuais Técnicos, Cadernos de Atenção Básica, n. 21, 2007.
- [8] CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “PROFESSOR ALEXANDRE VRANJAC”. Vigilância Epidemiológica e controle da esquistossomose, Normas e Instruções. 2007. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/manu_esqui.pdf. Acesso em: 10 jul. 2014.
- [9] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Situação epidemiológica da esquistossomose mansônica no Brasil. Junho de 2011. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresent_esquistossomose_mansoni_30_05_2011.pdf. Acesso em: 02 fev 2013.
- [10] SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE ALAGOAS. Informe sobre a esquistossomose nº 2. Jan-Jun 2012.

- [11] SCHOLTE, R. G.; GOSONI, L.; MALONE, J. B.; CHAMMARTIN, F.; UTZINGER, J.; VOUNATSOU, P. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geo-statistical models. **Acta Tropica**, v. 132, p. 57-63, 2014.
- [12] SIQUEIRA-BATISTA, R.; RAMOS JR., A. N.; FARINAZZO, R. J. M., *et al.* O *Schistosoma mansoni*. In: Huggins, D. W.; Siqueira-Batista, R.; Medeiros, L. B.; Ramos Jr., A. N. **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, 1998. p. 26-32.
- [13] NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VICTOR, R. W. A. Parasitologia humana. 11ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 193-212.
- [14] GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-1118, 2006.
- [15] ROFATTO, H. K.; LEITE, L. C. C.; TARARAM, C. A.; KANNO, A. I.; MONTOYA, B. O. A.; FARIAS, L. P. Antígenos vacinais contra esquistossomose mansônica: passado e presente. **Revista da Biologia**, p. 54-59, 2011.
- [16] SOUZA, F. P. C.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA JR., F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**. São Paulo, p. 300-307, 2011.
- [17] BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 250-269, 1989.
- [18] CAPRON, A.; CAPRON, M.; RIVEAU, G. Vaccine development against schistosomiasis: from concepts to clinical trials. **British Medical Bulletin**, v. 62, p. 139-148, 2002.
- [19] KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397-400, 1972.
- [20] KATZ, N.; COELHO, P. M. Z.; PELLEGRINO, J. Evaluation of Katos quantitative method through recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. **Journal of Parasitology**, v. 56, n. 5, p. 1032, 1970.
- [21] ANGELUCCI, F.; BASSO, A.; BELLELLI, A.; BRUNORI, M.; PICA MATTOCCIA, L.; VALLE, C. The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. **Parasitology**, v. 134, p. 1215-1221, 2007.

- [22] DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 659–667, 2008.
- [23] STOTHARD, J. R.; CHITSULO, L.; KRISTENSEN, T. K.; UTZINGER, J. Control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa: progress made, new opportunities and remaining challenges. **Parasitology**, v.136, p.1665–1675, 2009.
- [24] BEAUMIER, C. M.; GILLESPIE, P. M.; HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E. New vaccines for neglected tropical diseases and dengue. **Translational Research**, v. 162(3), p. 144-155, 2013.
- [25] ESTEVES, A.; JOSEPH, L.; PAULINO, M.; EHRLICH, R. Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths. **International Journal for Parasitology**, v. 27(9), p. 1013-1023, 1997.
- [26] TENDLER, M.; SIMPSON, A. J. The biotechnology-value chain: development of *Sm14* as a schistosomiasis vaccine. **Acta Tropica**, v. 108, p. 263-266, 2008.
- [27] CHRISTOPHERSON, R. I.; LYONS, S. D.; WILSON, P. K. Inhibitors of *de novo* nucleotide biosynthesis as drug. **Accounts of Chemical Research**, v. 35(11), p. 961-971, 2002.
- [28] CHEN, S. F.; PERRELLA, F. W.; BEHRENS, D. L.; PAPP, L. M. Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase activity by Brequinar Sodium. **Cancer Research**, v. 52(13), p. 3521–3527, 1992.
- [29] JOCKEL, J.; WENDT, B.; LOEFFLER, M. Structural and functional comparison of agents interfering with dihydroorotate, succinate and NADH oxidation of rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 56(8), p. 1053-1060, 1998.
- [30] HARDER, A.; HABERKORN, A. Possible mode of action of toltrazuril: studies on two *Eimeria* species and mammalian and *Ascaris suum* enzymes. **Parasitology Research**, v. 76(1), p. 8-12, 1989.
- [31] ITTARAT, I.; ASAWAMAHASAKDA, W.; BARTLETT, M. S.; SMITH J. W.; MESHNICK, S. R. Effects of atovaquone and other inhibitors on *Pneumocystis carinii* dihydroorotate dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39(2), p. 325–328, 1995.
- [32] ANNOURA, T.; NARA, T.; MAKIUCHI, T.; HASHIMOTO, T.; AOKI, T. The origin of dihydroorotate dehydrogenase genes of kinetoplastids, with special reference to their biological significance and adaptation to anaerobic, parasitic conditions. **Journal of Molecular Evolution**, v. 60(1), p. 113-127, 2005.

- [33] NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. Third edition. New York: Worth Publishers, 2000, p.243.
- [34] JONES, M.E. Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: Gene, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 253-279, 1980.
- [35] BJORNBERG, O.; ROWLAND, P.; LARSEN, S.; JENSEN, K. F. Active site of dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* investigated by chemical modification and mutagenesis. **Biochemistry**, v. 36(51), p. 16197-16205, 1997.
- [36] NONATO, M. C.; COSTA-FILHO, A. J. The Dihydroorotate dehydrogenases. In: HILLE, R.; MILLER, S. M.; PALFEY, B. **Flavoproteins**. Berlim: de Gruyter, 2013.
- [37] NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of Biochemistry. Fifth edition. New York: W. H. Freeman and Company, 2008.
- [38] LIU, S.; NEIDHARDT, E. A.; GROSSMAN, T. H.; OCAIN, T.; CLARDY, J. Structures of human dihydroorotate dihydrogenase in complex with antiproliferative agents. **Structure**, v. 8, p. 25-33, 1999.
- [39] RAWLS, J.; KNECHT, W.; DIEKERT, K.; LILL, R.; LÖFFLER, M. Requirements for the mitochondrial import and localization of dihydroorotate dehydrogenase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2079-2087, 2000.
- [40] TAKASHIMA, E.; INAOKA, D. K.; OSANAI, A.; NARA, T.; ODAKA, M.; AOKI, T.; INAKA, K.; HARADA, S.; KITA, K. Characterization of the dihydroorotate dehydrogenase as a soluble fumarate reductase in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 122(2), p. 189-200, 2002.
- [41] ROWLAND, P. et al. The crystal structure of *Lactococcus lactis* dihydroorotate dehydrogenase: A complexed with the enzyme reaction product throws light on its enzymatic function. **Protein Science**, v. 7, p. 1269-1279, 1998.
- [42] BJORNBERG, O.; GRUNER, A. C.; ROEPSTORFF, P.; JENSEN, K. F. The activity of *Escherichia coli* dihydroorotate dehydrogenase is dependent on a conserved loop identified by sequence homology, mutagenesis, and limited proteolysis. **Biochemistry**, v. 38(10), p. 2899-2908, 1999.
- [43] OTTOSEN, M. B., BJORNBERG, O.; NORAGER, S.; LARSEN, S.; PALFEY, B. A.; JENSEN, K. F. The dimeric dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis* dissociates reversibly into inactive monomers. **Protein Science**, v. 11, n. 11, p. 2575-2583, 2002.

- [44] ROWLAND, P.; NIELSEN, F. S.; JENSEN, K. F.; LARSEN, S. The crystal structure of the flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase A from *Lactococcus lactis*. **Structure**, v. 5(2), p. 239-252, 1997.
- [45] GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server**. (In) John M. Walker: The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). p. 571-607. Disponível em: <<http://web.expasy.org/protparam/>>. Acesso em: 08 fev. 2014.
- [46] PEARSON, W. **Alignment of 2 sequences**. Swiss Institute of Bioinformatics. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=lalign&context=protein>>. Acesso em: 13 jun. 2013.
- [47] HANSEN, M.; LE NOURS, J.; JOHANSSON, E.; ANTAL, T.; ULLRICH, A.; LOFFLER, M.; LARSEN, S. Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. **Protein Science**, v. 13(4), p. 1031-1042, 2004.
- [48] SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 20, p. 341-356, 1983.
- [49] SENFT, A. W.; SENFT, D. G.; MIECH, R. P. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. II. Disposition of adenosine by whole worms. **Biochemical pharmacology**, v. 22, p. 437-447, 1973.
- [50] AOKI, T.; OYA, H. Glutamine-dependent carbamoyl-phosphate synthetase and control of pyrimidine biosynthesis in the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. **Comparative biochemistry and physiology**, v. 63, p. 511-515, 1979.
- [51] HILL, B.; KILSBY, J.; ROGERSON, G. W.; MCINTOSH, R. T.; GINGER, C. D. The enzymes of pyrimidine biosynthesis in a range of parasitic protozoa and helminths. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 2, p. 123-134, 1981.
- [52] EL KOUNI, M. H.; NAGUIB, F. N. Pyrimidine salvage pathways in adult *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v. 20, p. 37-44, 1990.
- [53] JAFFE, J. J.; MCCORMACK, J. J.; MEYMARIAN, E. Comparative properties of schistosomal and filarial dihydrofolate reductases. **Biochemical pharmacology**, v. 21, p. 719-731, 1972.
- [54] JAFFE, J. J. Dihydrofolate reductase from filarial worms and schistosomes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 186, p. 113-114, 1971.

- [55] PEROUTKA, Iii R. J.; ORCUTT, S. J.; STRICKLER, J. E.; BUTT, T. R. SUMO fusion technology for enhanced protein expression and purification in prokaryotes and eukaryotes. **Methods in Molecular Biology**, v. 705, p. 15-30, 2011.
- [56] PÁDUA, R. A. P. **Structural and functional characterization of *Trypanosoma cruzi* fumarate hydratase isoforms**. 2014. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.
- [57] AUSUBEL, F. M., R. BRENT, et al. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, 1995.
- [58] SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. D. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [59] SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p. 76-85, 1985.
- [60] MILLER, R. W. Dihydroorotate dehydrogenase (*Neurospora*). **Methods Enzymology**, v. 51, p. 63-69, 1978.
- [61] NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica. Terceira edição. São Paulo: Sarvier, 2002, 975p.
- [62] JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67(3), p. 289-298, 2005.
- [63] SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115 (2), p. 113-128, 2005.
- [64] PÁDUA, R. A. P.; TOMALERI, G. P.; REIS, R. A. G.; DAVID, J. S.; SILVA, V. C.; PINHEIRO, M. P., NONATO, M. C. Thermo-FMN – A thermofluor assay developed for ligand-screening as an alternative strategy for drug discovery. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2014.
- [65] WASSERFALLEN, A.; HUBER, K.; LEISINGER, T. Purification and structural characterization of a flavoprotein induced by iron limitation in methanobacterium-thermoautotrophicum Marburg. **Journal of Bacteriology**, v. 177(9), p. 2436-2441, 1995.
- [66] MARCINKEVICIENE, J.; JIANG, W. J.; LOCKE, G.; KOPCHO, L. M.; ROGERS, M. J.; COPELAND, R. A. A second dihydroorotate dehydrogenase (type A) of the human pathogen *Enterococcus faecalis*: Expression, purification, and steady-state kinetic mechanism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 377, p. 178-186, 2000.

- [67] FELICIANO, P. R.; CORDEIRO, A. T.; COSTA, A. J.; NONATO, M. C. Cloning, expression, purification, and characterization of *Leishmania major* dihydroorotate dehydrogenase. **Protein Expression and Purification**, v. 48, p. 98-103, 2006.
- [68] KNECHT, W.; BERGJOHANN, U.; GONSKI, S.; KIRSCHBAUM, B.; LOFFLER, M. Functional expression of a fragment of human dihydroorotate dehydrogenase by means of the baculovirus expression vector system, and kinetic investigation of the purified recombinant enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, p. 292-301, 1996.
- [69] ULLRICH, A.; KNECHT, W.; PISKUR, J.; LOFFLER, M. Plant dihydroorotate dehydrogenase differs significantly in substrate specificity and inhibition from the animal enzymes. **Febs Letters**, v. 529, p. 346-350, 2002.
- [70] LIMA, N. M.; DOS SANTOS, A. F.; PORFÍRIO, Z.; GOULART, M. O.; SANTANA, A. E. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Tropica*, v. 83(1), p. 43-47, 2002.