UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

NATÁLIA KARLA BELLINI

**Estudo celular, bioquímico e biofísico da enzima selenofosfato
sintetase de *Naegleria gruberi***

São Carlos

2015

NATÁLIA KARLA BELLINI

**Estudo celular, bioquímico e biofísico da enzima selenofosfato
sintetase de *Naegleria gruberi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestra em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Otavio Henrique
Thiemann

Versão Corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2015

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.

Ficha catalográfica revisada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bellini, N. K.

Estudo celular, bioquímico e biofísico da enzima selenofosfato sintetase de *Naegleria gruberi*. / N. K. Bellini; orientador Otavio Henrique Thiemann - versão corrigida -- São Carlos, 2015.
159 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. *Naegleria gruberi*. 2. Selenofosfato sintetase.
3. Selenocisteína.. I. Thiemann, Otavio Henrique, orient. II. Título.

À minha família, com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Otavio Henrique Thiemann, pela orientação e pelo aprendizado ao longo deste trabalho. Obrigada pela confiança e pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biologia Estrutural(IFSC-USP).

Ao Dr. Marco Túlio Alves da Silva, pela empolgação diária em discutir a pesquisa, pelas ideias e pela contribuição neste trabalho.

Ao Ivan, pelo auxílio com os experimentos e incentivo para aplicar as novas ideias.

Ao B2 (Vitor), pelas conversas, acompanhamento e contribuição em etapas desta pesquisa.

Ao Thomas, por todas as vezes em que cuidamos juntos das culturas de células e nos ajudamos em ambas as pesquisas.

Aos queridos Ana, Thomas, Érika, Camila, Jéssica, Teresa, Adriano, Guilherme, B2 (Vitor), Ivan, Túlio, Alan, Renata, Paulo e Matheus. Obrigada pela amizade, pelas discussões construtivas em reuniões e por tornarem o nosso grupo mais agradável. É muito bom trabalhar com vocês!

À Mery, Fer, Paola, Diego, Júliana, Marilha, Gabi, Nayara e Lari, em nome de quem agradeço a companhia de todos os amigos do laboratório.

Aos professores e técnicos do Laboratório de Biologia Estrutural. Em especial à Susana, pelas conversas e pelo apoio técnico e ao Humberto pelo auxílio com os ensaios de cristalização.

À Isabel, em nome de quem agradeço a todos os técnicos, alunos e professores do Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC-USP).

À Jaqueline, pela amizade, e por ter me guiado nos primeiros passos no laboratório.

À Patrícia e ao Ricardo, em nome de quem agradeço aos funcionários da secretaria da Pós, por serem sempre muito solícitos!

À Cristina, Neusa e Sabrina, em nome de quem agradeço a todo o serviço da biblioteca do IFSC.

Ao Thiago Amaral, pela amizade e contribuição neste trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado. Projeto nº 2013/15935-5

À todos os amigos que ganhei durante a organização da SIFSC, por todas as discussões construtivas, pelo acolhimento e amizade. Em especial ao Chris (Edmilson), Milena, Thiago, Raul, Jéssica, Amina, Vírgula, Pedro, Pato (Luiz Sena) e Diogo.

À Paty, Malú (Maria Luiza) e Fer (Fernando): aos seis anos de amizade, confiança e carinho que nos une... obrigada! Vocês sempre serão essenciais.

Às queridas amigas Hilde e Nádia, pelas conversas, pela reposição de energia em cada almoço e reencontro. Por saber que nossas vidas, independente da distância, seguirão conectadas. Pelo meu querido amigo João, pela alegria de viver e por todos os abraços e conversas. Ao Dani, Cáspar, Itú e Luiza, em nome dos quais agradeço ao Grupo Acaso de Teatro, pelo aprendizado e energia. Aos irmãos Garbuiu, pelo sorriso motivante em cada encontro, pelos abraços e pela amizade!

Ao Raul, com quem gosto muito de compartilhar a vida. Por estar comigo nesta caminhada e por torná-la mais especial.

Ao meus avós, Vô Zé, Vó Ana (*in memoriam*), Vô Chico e Vó Iracima, pelo carinho e admiração. Aos primos Lara, Helena, Lilian, Caco, Paula e Mário, pela amizade e pelo divertimento no sítio. À Tia Célia que sempre me incentivou nos estudos, em nome de quem agradeço à todos os meus familiares.

Aos meus queridos pais, Luiz e Deise, por todo o amor, carinho e confiança. Por serem a minha força para continuar nos momentos de dificuldade. Ao meu irmão, Kiko, meu grande amigo, que sempre esteve comigo em cada nova escolha da minha vida. Amo vocês e agradeço a Deus por dividirmos a vida em família!

À todos que de modo direto ou indireto contribuíram para a realização deste trabalho, obrigada!

“Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender.”

Paulo Freire, 1997

RESUMO

BELLINI, N. K. **Estudo celular, bioquímico e biofísico da enzima selenofosfato sintetase de *Naegleria gruberi***. 2015. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

O microrganismo alvo deste estudo pertence ao gênero *Naegleria*, que compreende amebas de vida livre amplamente distribuídas ao redor do mundo. Estas possuem estratégias de adaptação em condições de temperatura e pH que envolvem a diferenciação das células para as formas flagelada e cística. A via de biossíntese e incorporação do aminoácido selenocisteína (Sec, U) em *N. gruberi* foi descrita e, devido à incorporação co-traducional deste aminoácido em resposta a um códon UGA em fase de leitura, possui diversos fatores específicos que tornam a via alvo de estudos moleculares. Dentre os genes identificados, destaca-se o de selenofosfato sintetase (SPS), uma proteína funcionalmente dimérica envolvida na catálise da conversão de seleneto e adenosina 5'-trifosfato (ATP) em selenofosfato, essencial à síntese de Sec. Diferindo das SPSs homólogas, em *N. gruberi* a proteína (NgSPS2) é codificada em fusão N-terminal com uma metiltransferase e totaliza 737 aminoácidos. Esta descoberta motivou os objetivos da pesquisa baseada na investigação celular de NgSPS2 nativa nas três diferentes formas de vida de *N. gruberi* através de ensaios imunoenzimáticos, e a caracterização bioquímica e biofísica da proteína recombinante. A análise dos resultados obtidos por *Western blot* indicaram que NgSPS2, *in vivo*, apresenta os dois domínios metiltransferase e SPS separados após a tradução para uma cultura amebóide e, após alcançar a diferenciação de cada uma das formas isoladamente, este resultado se confirmou também para cistos e flagelados. A investigação de *N. gruberi* em cultura indica o aumento na atividade da via de síntese de selenoproteínas na presença de selênio conferindo resistência às condições de estresse oxidativo. A caracterização bioquímica do domínio C-terminal de NgSPS2, por cromatografia de exclusão molecular analítica e eletroforese não desnaturante, revelou predominância de dímeros em solução, coerente com SPSs homólogas. Os testes de cristalização não resultaram na obtenção de cristais, porém a proteólise limitada permitiu selecionar tripsina como potencial para a clivagem do N terminal do N terminal flexível. A conservação dos resíduos de aminoácidos funcionais em NgSPS2.CTD e seu comportamento em solução confirmam a obrigatoriedade da união de cada monômero e, por isso o domínio metiltransferase adicional pode ser desfavorável à montagem do dímero e *in vivo* a fusão é desfeita após a tradução.

Palavras chave: *Naegleria gruberi*. Selenofosfato sintetase. Selenocisteína.

ABSTRACT

BELLINI, N. K. **Biochemical, biophysical and cellular studies of selenophosphate synthetase from *Naegleria gruberi***. 2015. 159 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The target microorganism of the present study belongs to the *Naegleria* genus. This genus includes free life amoebas widely distributed around the world that, in order to survive in bad temperature and pH environments, developed an adaptive strategy consisting of cells differentiation to flagellate and cystic form. The biosynthesis and incorporation of selenocysteine amino acid (Sec, U) in *N. gruberi* has been described and, because of the co-translational incorporation of this amino acid in response to a UGA codon during the reading step, this process has several specific factors which make it a target for molecular studies. Among the identified genes, we can highlight the one which encodes the selenophosphate synthetase that is involved in the catalytic conversion of selenite and adenosine triphosphate into selenium phosphate, a necessary step to the Sec synthesis that uses selenide and ATP to produce selenophosphate. SPS from *N. gruberi* is encoded with an methyltransferase N-terminal fused with the typical SPS C-terminal domain, an open read frame that contains 2211 nucleotides encoding 737 amino acids. This discovery has motivated the initial aims of this project, based on the cellular investigation of SPS2, native on the three different form lifes of *N. gruberi*, through immunoenzymatic assays, besides a study with the recombinant protein to clarify the biochemistry and biophysics features of *NgSPS2*. The results indicated that the protein do not keep both domains fused after the translation process, suggesting that they need to be separated to perform their biological function. The investigation of the *N. gruberi* culture revealed that the cells become less sensitive to stress agent in the presence of selenium, which seems to be correlated with the increasing activity of the selenoprotein synthesis. The biochemistry characterization of the *NgSPS2* C-terminal domain, using size exclusion chromatography and electrophoresis under non-denaturing conditions revealed the predominance of dimers in solution according with the typical homologous SPS oligomeric state. The crystallization tests have not resulted in crystal growth; however, the limited proteolysis may be an alternative to optimize the crystallization process. These studies may enlarge the knowledge about the biosynthesis of Sec. in *N. gruberi*.

Key-words: *Naegleria gruberi*. Selenophosphate synthetase. Selenocysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Seção da filogenia bayesiana concatenada de quatro genes (SS-dRNA, actina, α -tubulina, β -tubulina) evidenciando o posicionamento do grupo JEH em relação ao supergrupo Amoebozoa. Destacadas em vermelho temos <i>Naegleria gruberi</i> (JEH) e <i>Acanthamoeba castellanii</i> (Amoebozoa).....	28
Figura 2 -	Seção do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Rpl24A evidenciando a inserção dos resíduos adicionais para os membros do grupo JEH (corados em tons de cinza).	29
Figura 3 -	Ciclo de vida de <i>Naegleria spp</i>	30
Figura 4 -	Mapa com a distribuição das vítimas identificadas com PAM entre 1962 e 2009 ao e casos.....	32
Figura 5 -	Ciclo de vida de <i>N. fowleri</i> incluindo passagem pelo hospedeiro humano.....	33
Figura 6 -	Representação dos aminoácidos cisteína e selenocisteína com evidencia para os elementos S e Se de cada grupo lateral.....	38
Figura 7 -	Estrutura secundária de um tRNA canônico (A), tRNA ^{[Ser]Sec} típico de Bacteria (B), tRNA ^{[Ser]Sec} de Archaea e Eukarya (C) além do tRNA ^{[Ser]Sec} identificado para <i>N. gruberi</i> . O círculo vermelho nos três últimos modelos indica o anticódon UCA complementar ao códon UGA do mRNA de Sec.....	42
Figura 8 -	Representação do elemento SECIS em Eukarya (A - forma I e B - forma II), Archaea (C) e Bacteria (D). Em A e B estão representados os nucleotídeos conservados incluindo AA (ou CC) na alça apical e o quarteto não Watson-Crick no ápice da primeira volta precedido pelo resíduo conservado A (ou G).....	43
Figura 9 -	Biossíntese de selenocisteína em Bacteria. As enzimas destacadas em vermelho são responsáveis pela conversão de tRNA ^{[Ser]Sec} a Sec - tRNA ^{[Ser]Sec} . SerRS representa a proteína seril-tRNA sintetase, SelA corresponde a selenocisteína sintase e SelD a selenofosfato sintetase.....	44
Figura 10 -	Incorporação de Sec – tRNA ^{[ser]sec} no peptídeo nascente para formação de uma selenoproteína em Bacteria. SelB é o fator de elongação específico de selenocisteína e o elemento SECIS localiza-se adjacente ao códon UGA.....	45
Figura 11 -	Biossíntese de Sec em Eukarya e Archaea.....	46
Figura 12 -	Modelo para inserção de Sec em proteínas de Eukarya. O elemento SECIS está localizado na região não traduzida (3'UTR) do mRNA das selenoproteínas.....	47
Figura 13 -	Esquema da última etapa da via de inserção de Sec em selenoproteínas de Archaea. A seta vermelha indica que o reconhecimento entre o elemento SECIS, o Sec-tRNA ^{[Ser]Sec} carregado por EFSec e o ribossomo não está bem definido.....	48
Figura 14 -	Maquinaria de inserção de Sec em <i>N. gruberi</i>	49
Figura 15 -	Sequência de aminoácidos conservados que definem a superfamília PurM. Estes resíduos, circundados em vermelho, são responsáveis pela ligação de ATP nas sequências utilizadas como modelo: PurM (<i>Escherichia coli</i>), PurL (<i>Thermotoga marítima</i>), ThiL (<i>Aquifex aeolicus</i>), SelD (<i>Aquifex aeolicus</i>) e HypE (<i>Escherichia coli</i>), respectivamente.....	50

Figura 16 -	Comparativo entre o enovelamento padrão de uma representante da superfamília PurM e uma selenofosfato sintetase. A - Estrutura dimérica de PurM de <i>E. coli</i> (PDB: 1CLI) demonstrando dois monômeros (um em azul e o outro em amarelo). B - dímero de SPS de <i>A. aeolicus</i> (PDB: 2ZOD). Em ambas as representações, entre o C-terminal e N-terminal de cada monômero encontra-se o sítio catalítico.....	51
Figura 17 -	Esquema do mecanismo catalítico de SPS. As letras A – E indicam as etapas propostas para a reação.....	53
Figura 18 -	Representação dos dois domínios de NgSPS2.....	54
Figura 19 -	Representação do método de contagem das células. A - Uma série de oito agitações nas laterais da garrafa promoveu a individualização das células. B - Uma gota do meio de cultivo contendo as células em suspensão foi depositada em câmara de <i>Neubauer</i> . C - Os quatro quadrantes externos, Q = 1 mm ² cada, foram contabilizados.....	61
Figura 20 -	Placa de 12 poços com as respectivas soluções utilizadas para indução da exflagelação.....	65
Figura 21 -	Modelo de recorte da membrana de nitrocelulose para incubação isolada com diferentes concentrações de anticorpo em um mesmo <i>western blot</i> . Inicialmente a membrana de nitrocelulose foi recortada em faixas (1) que foram imersas separadamente numa placa especial (2) para incubação com diferentes títulos do anticorpo (3) incluindo comparativo entre os soros ímune (I) e pré ímune (P.I.)	70
Figura 22 -	Representação do primeiro teste de suplementação de selênio. A figura mostra uma placa de 12 poços com suas respectivas concentrações (em µM) de selenito de sódio, incluindo uma cultura controle (A1) na ausência do composto.....	71
Figura 23 -	Etapas envolvidas na suplementação das células de <i>N. gruberi</i> . A numeração 1, 2 e 3 orienta a sequência de eventos aplicados neste experimento.....	72
Figura 24 -	Representação das ligações envolvidas na cromatografia de afinidade. 1 - constituintes da matriz (NTA e Sepharose CL-6B) interagindo com os resíduos de histidina da fase móvel. 2 - estrutura do composto imidazol e do aminoácido histidina.....	79
Figura 25 -	Representação da luz polarizada elipticamente após atingir a amostra quiral.....	84
Figura 26 -	Espectros de dicroísmo circular demonstrando as diferenças na elipticidade molar em relação à variação no comprimento de onda.....	86
Figura 27 -	Componentes envolvidos nos dois métodos de difusão de vapor <i>sitting drop</i> (1) e <i>hanging drop</i> (2)	87
Figura 28 -	Esquema de uma placa de cristalização, método <i>sitting drop</i> . As gotas de cristalização (0,7µl de proteína com 0,7µl da solução precipitante) numeradas 1, 2 e 3 indicam, respectivamente, solução proteica de NgSPS2.CTD não clivada com trombina, NgSPS2.CTD após clivagem com trombina e NgSPS2.CTD clivada com tripsina.....	88
Figura 29 -	Obtenção de cistos de <i>N. gruberi</i> a partir da adição de sarcosil (método 1) ou encistamento natural (método 2). As imagens de 1-4 para o método 1 foram adquiridas nos tempos 10, 40, 80 e 120 minutos, respectivamente. As fotos de 1-3 para o método 2 foram adquiridas após 120, 144 e 216 horas, respectivamente.....	94
Figura 30 -	Resultado do desencistamento. As imagens 1 e 2 representam, respectivamente, a cultura após 30 minutos na presença de CO ₂ e após 3 horas mantida sob condições normais para completar a eclosão.....	97

Figura 31 -	Diferenciação celular para obtenção de <i>N. gruberi</i> na forma flagelar. As imagens 4.A e 4.A' representam o grupo das culturas mantidas em meio ATCC 1034 com adição de cinco sais (25 mM NaCl, KCl, CaCl ₂ , LiCl, ou MgCl ₂). 7.1 e 6.1 representam o cultivo baseado na substituição de ATCC 1034 por 2 mM Tris (métodos 5 ao 7.1). Por último, 4.H e 4.H' são exemplares das células cujo meio ATCC 1034 foi substituído por água além da adição dos cinco sais. Neste caso 4.H e 4.H' contêm, respectivamente 25mM NaCl e 25mM MgCl ₂ assim como 4.A e 4.A'. Os círculos em vermelho indicam a presença de uma ou mais células enflageladas.....	98
Figura 32 -	Flagelados de <i>N. gruberi</i> . Fotos obtidas após selecionado o melhor método de enflagelamento (4.1). As fotos 4.1a e 4.1b tratam-se da ampliação da obtiva para visualização do flagelo duplo.....	100
Figura 33 -	Avaliação dos métodos de extração proteica. Membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) corada com 0,2 % <i>Ponceau</i> . Da esquerda para a direita: Marcador molecular (<i>Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder</i> - Life Technologies); amostras de extrato proteico de <i>N. gruberi</i> lisado sob cinco diferentes métodos baseados no tampão RIPA (colunas 1-3) ou Laemmli (colunas 4 e 5).....	101
Figura 34 -	Membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) reveladas após triagem de titulação para <i>antiNgSPS2.FL</i> . As colunas representam inicialmente o padrão de massa molecular seguido por canaletas de número ímpar (incubadas com soro imune) e número par (incubadas com soro pré imune). A - contém a titulação 1:650 (colunas 1 e 2), 1:750 (3 e 4), 1:850 (5 e 6) e 1:950 (7 e 8). B - apresenta as diluições de 1:1050 (1 e 2) e 1:1150 (3 e 4). As setas vermelhas indicam as bandas referentes à <i>NgSPS2</i>	103
Figura 35 -	Teste de titulação de <i>antiNgSPS2.CTD</i> . Membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience). A primeira canaleta contém o padrão de massa molecular (<i>Spectra Broad Range Multicolor</i>) seguida pelos extratos proteicos ameboides incubados com 1:4000 (coluna 1), 1:5000 (2), 1:5500 (3) e 1:6000 do soro imune <i>antiNgSPS2.CTD</i> e, os extratos proteicos de 5 a 7 foram incubados com 1:4000; 1:5000 e 1:5500 do soro pré imune. A seta vermelha indica a banda referente à proteína <i>NgSPS2</i> . (<i>Western Blot 2</i> , tabela 5, item 3.1.5).....	104
Figura 36 -	Membrana nitrocelulose (Hybond ECL Amersham Bioscience) revelada após <i>Western Blot</i> comparativo identificando <i>NgSPS2</i> nas três formas de <i>N. gruberi</i> . A primeira coluna contém o marcador de massa molecular seguido por nove extratos proteicos sendo três de amebas (1,2 e 3), três de flagelados (4, 5 e 6) e três de cistos (7, 8 e 9). A aplicação tripla de cada extrato permitiu incubar, separadamente, as fitas da membrana com 1:600 (canaletas 1, 4 e 7), 1:900 (2, 5 e 8) e 1:1000 (3, 6 e 9) do anticorpo primário <i>antiNgSPS2.FL</i> . Novamente, a linha pontilhada em vermelho serviu apenas para orientar o comparativo entre as bandas.....	105
Figura 37 -	Avaliação de <i>NgSPS2</i> nativa em extratos de cistos, amebas e flagelados. Membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) após corar com <i>Ponceau</i> (5', 5.1' e 4') e após incubadas com anticorpos e reveladas por quimiluminescência (5, 5.1 e 4). A primeira coluna de cada membrana contém o padrão de massa molecular. O <i>Western Blot 5</i> representa aplicação de 40µg total da proteína obtidas nas formas amebóide (colunas 1 e 4), flagelados (2 e 5) e cístico (3 e 6) incubadas com o soro imune (colunas 1 a 3) ou pré imune (4 a 6) de <i>antiNgSPS2.FL</i> na diluição 1:1000. O <i>Western Blot 5.1</i> contém exatamente o mesmo padrão de amostras que a membrana 5, porém o título escolhido foi de 1:1150 <i>antiNgSPS2.FL</i> . Por último, a membrana 4 contém 40µg total do extrato proteico de células ameboides, cística e flagelar nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente e foi incubado com soro imune <i>antiNgSPS2.CTD</i> na diluição 1:4000.....	107

Figura 38 -	Análise fenotípica das células de <i>N. gruberi</i> na presença de selenito de sódio. Todas as fotos foram adquiridas com o mesmo tempo de incubação (após 140 horas de cultivo). Os números de 1 a 10 representam, respectivamente, a amostra controle não suplementada com selenito seguida por culturas cujo selenocomposto foi adicionado nas concentrações de 3, 5, 10, 15, 25, 50, 100 e 500 μM	112
Figura 39 -	Análise de <i>Western Blot</i> para comparativo entre a expressão de NgSPS2 em células de <i>N. gruberi</i> estressadas com peróxido de hidrogênio na presença ou ausência de 10 μM selenito de sódio. Ambas as membranas contêm 40 μg do extrato proteico total referente as células mantidas com 500 μM H_2O_2 (canaletas 1 e 3) e referente as culturas que, além de 500 μM H_2O_2 , foram enriquecidas com 10 μM selenito de sódio (canaletas 2 e 4). A primeira membrana (A) foi incubada com <i>antiNgSPS2.FL</i> e a segunda membrana (B) com <i>antiActina</i> . A primeira canaleta de cada membrana corresponde ao marcador molecular.....	117
Figura 40 -	Predição de domínios conservados para sequência de NgSPS2 avaliada pelo servidor SMART. A linha numerada de 0 a 700 orienta o posicionamento dos domínios em relação à sequência completa dos 737 aminoácidos. A numeração ao final de cada traço pontilhado indica os resíduos iniciais e finais, respectivamente, para cada um dos domínios. Na porção superior foram indicadas as pontuações <i>E-value</i> correspondentes à predição. Também foi destacada nesta representação uma região com baixa identidade estrutural, dos aminoácidos 326 a 369.....	119
Figura 41 -	Representação da sequência primária de NgSPS2 analisada pelo servidor Blastp. Os dois retângulos cinza na porção inferior da imagem refletem a conservação de domínios com similaridade à N e C-terminal de selenofosfato sintetase. O código de acesso CDD para ambas sequencias é pfam13847 (Metiltransferase_31) e cl10019 (Superfamília PurM), respectivamente. Os números 1 e 2 representam dois conjuntos de resíduos conservados responsáveis pela ligação de NgSPS2 ao ATP e pela interface de dimerização, respectivamente.....	120
Figura 42 -	Alinhamento da sequência de aminoácidos de selenofosfato sintetase homólogas. Apenas regiões parciais do alinhamento estão indicadas na figura para destacar os resíduos de maior importância catalítica ou estrutural. Representantes dos três domínios foram utilizados para análise sendo Eukarya(<i>Naegleria gruberi</i> , <i>Leishmania major</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> e <i>Homo sapiens</i>), Archaea(<i>Methanococcus jannaschii</i>) e Bacteria (<i>Escherichia coli</i> e <i>Aquifex aeolicus</i>). Os resíduos foram corados de acordo com a função que desempenham na proteína: azul claro para regiões de interface de dimerização, verde para resíduos envolvidos na ligação a ATP e rosado para a região rica em glicina composta por cisteína (ou selenocisteína) e lisina com atividade catalítica. Os resíduos destacados em vermelho esta envolvidos em ambas as funções de ligação ao ATP e interface de dimerização.....	121
Figura 43 -	Resultado do teste de expressão piloto para NgSPS2.FL. A - alíquotas que permaneceram sob indução à 37°C. B - células mantidas a 20°C. O marcador molecular MMM foi aplicado na primeira canaleta de cada gel. Na sequência temos a amostra antes da indução com IPTG e as alíquotas retiradas temporalmente durante as 12 horas.	123
Figura 44 -	Expressão em larga escala de NgSPS2.FL. Fração do precipitado (sedimento/insolúvel) e sobrenadante (amostra solúvel) após a lise e centrifugação. A banda evidente na segunda coluna revela a insolubilidade da proteína.....	124
Figura 45 -	Resultado da solubilização alcalina de NgSPS2.FL. Gel poliacrilamida 10%. A primeira canaleta contém o padrão de massa molecular M (kDa). Na sequência temos I ₁ (fração insolúvel obtida após centrifugação, durante a primeira lavagem), I ₂ e S ₂ (frações insolúvel e solúvel, respectivamente, após o segundo passo de lavagem), I ₃ e S ₃ (insolúvel e solúvel para terceira lavagem), P.d (amostra resultante após a diálise), I _f e S _f (amostras insolúvel e solúvel após centrifugação final) e	

	S _f '(mesma amostra S _f , em maior concentração)	125
Figura 46 -	Cromatograma referente à purificação por afinidade e análise eletroforética das frações eluídas. A) Gel poliácridamida 10% com marcador molecular (175 kDa; 80 kDa; 56 kDa) seguido pela amostra antes de ser aplicada na resina (3), amostra coletada durante o arraste na cromatografia (2) e amostra purificada após união do eluato (1). B) Cromatograma de NgSPS2.FL.....	126
Figura 47 -	Separação eletroforética do produto purificado em cromatografia de afinidade para coleta de NgSPS2.FL. O gel foi polimerizado sem a separação entre as canaletas permitindo a aplicação de volume maior de amostra (1,5 mg total).....	127
Figura 48 -	Análise de NgSPS2.FL após teste de solubilidade. No início de cada gel a coluna M(kDa) indica o marcador de massa molecular e os números de 1 a 7 representam, respectivamente, alíquotas solubilizadas com 10% glicerol (1), 1% Tween-20 (2), 20mM CHAPS (3), 1% N-Lauril sarcosina (4), 10% Nicodens (5), 1,5mM MgCl ₂ (6) e 1% Triton X-100 (7). As siglas p.c., (S) e (I) representam, respectivamente, o lisado bruto pré centrifugar seguido pelas amostras obtidas nas frações solúvel e insolúvel.....	128
Figura 49 -	Expressão de NgSPS2.CTD _(n.t.) . SDS-PAGE 15% contendo, na primeira canaleta, o padrão de massa molecular (MkDa) seguido pelos números de 1 a 4 que indicam, respectivamente, as frações insolúveis para pET32a e NgSPS2.CTD _(n.t.) e as frações solúvel para pET32a e para NgSPS2.CTD _(n.t.)	129
Figura 50 -	Purificação de NgSPS2.CTD _(n.t.) por cromatografia de afinidade. A: cromatograma indicando a eluição da amostra de interesse (linha preta) em comparativo com o aumento do tampão B (linha verde). B: SDS-PAGE 15%. A primeira coluna contém o marcador de massa molecular seguido pela numeração de 1 a 4 indicando, respectivamente, a amostra não ligada na coluna de níquel (VOID), a amostra insolúvel após expressão e lise de NgSPS2.CTD _(n.t.) , a amostra solúvel pré aplicação na resina e a fração eluída correspondente ao pico do cromatograma A.....	130
Figura 51 -	Resultado da purificação de NgSPS2.CTD _(n.t.) . O cromatograma guiou a coleta das amostras eluídas em cada um dos picos cuja análise foi feita em SDS-PAGE 15%. Os números 8-26, nas canaletas dos géis, referem-se aos volumes de eluição 8-26ml do cromatograma. As letras A, B e C do perfil cromatográfico correspondem às frações avaliadas nos três géis. A amostra P.C. no gel A indica a fração de NgSPS2.CTD _(n.t.) antes de ser aplicada na cromatografia. O marcador molecular (M) contém proteínas de tamanhos 175, 80 e 58 kDa respectivamente. D - Curva de calibração Superdex 200 10/300 (GE) para estimativa da massa molecular de NgSPS2.CTD.....	131
Figura 52 -	Resultado da purificação de NgSPS2CTD _(c.t.) em cromatografia de exclusão molecular. O perfil cromatográfico apresenta 3 principais picos de maior contribuição à absorbância representados pelas letras A, B e C. O SDS-PAGE 15% anexo a imagem contém, na primeira canaleta a fração pré cromatografia, seguido pelo marcador molecular com proteínas de massa 97,4; 66,2; 45; 31; 25,5 e 15 kDa. As colunas numeradas de 1 a 7 correspondem, respectivamente, à fração eluída com 11,18ml do tampão (1), amostras eluídas no pico A (canaletas 2-5), eluato dos picos B e C (6 e 7, respectivamente)	133
Figura 53 -	Eletroforese em gel nativo para avaliação do estado oligomérico de NgSPS2.CTD _(c.t.) . 1 - Coluna 1 contém a amostra NgSPS2.CTD _(c.t.) a 2,6 mg/mL encontrada nos estados dimérico (A) e tetramérico (B) e o marcador molecular de alta massa M (kDa) na coluna seguinte. 2 - curva de calibração da proteína para obtenção da equação da reta e cálculo da massa experimental.....	134
Figura 54 -	Análise dos sítios de reconhecimento de tripsina a partir da sequência primária de NgSPS2.CTD _(c.t.) . A - Identificação dos 40 possíveis sítios de clivagem indicados pelos resíduos arginina (R) ou lisina (K) corados em vermelho. B - representação	

	das duas regiões com estrutura identidade sequencial à AIRS_N-terminal em azul escuro e AIRS_C-terminal em azul claro. A região intermediária representada pelo segmento verde corresponde à sequência de aminoácidos entre os dois domínios.....	139
Figura 55 -	<i>NgSPS2.CTD_(c.t.)</i> clivada com 100µg/ml de tripsina. A - Gel poliacrilamida 15% com a análise do produto de clivagem ao longo do tempo (0-35 minutos). A primeira coluna contém o marcador de massa molecular e as colunas seguintes referem-se as alíquotas retiradas a cada 5 minutos de reação. B - sequencia primária de <i>NgSPS2.CTD_(c.t.)</i> evidenciando os 13 primeiros sítios de clivagem. C - Esquema indicando a região de clivagem no início do N-terminal representada pelo tracejado vermelho. D - Relação entre a massa molecular teórica predita para a sequência primária restante após a clivagem em cada um dos sítios preditos, valores calculados pelo ProtParam (Expasy)	139
Figura 56 -	<i>NgSPS2.CTD_(c.t.)</i> clivada com 250µg/ml tripsina. A - Gel poliacrilamida 15% com a análise do produto de clivagem ao longo do tempo (0-35 minutos). A primeira coluna contém o marcador de massa molecular e as colunas seguintes referem-se as alíquotas retiradas a cada 5 minutos de reação. B - sequencia primária de <i>NgSPS2.CTD_(c.t.)</i> evidenciando os quatro sítios de clivagem na ponta N-terminal e os 3 sítios de clivagem encontrados na região flexível entre os dois domínios. C - Esquema indicando as duas possíveis regiões de clivagem acessadas a partir do aumento na concentração da protease. D - Relação entre a massa molecular teórica predita para a sequência primária restante após a clivagem do grupo I (proteína clivadas apenas no N terminal) e do grupo II (proteínas clivadas na região de fusão entre os dois domínios) contendo a massa molecular calculada pelo ProtParam (Expasy)	141
Figura 57 -	<i>NgSPS2.CTD(c.t.)</i> clivada com 500µg/ml tripsina. A - Gel poliacrilamida 15% com a análise do produto de clivagem ao longo do tempo (0-35 minutos). A primeira coluna contém o marcador de massa molecular e as colunas seguintes referem-se às alíquotas retiradas a cada 5 minutos de reação. B - sequencia primária de <i>NgSPS2.CTD_(c.t.)</i> evidenciando os 3 sítios de clivagem acessados por tripsina. C - Esquema indicando região clivada a partir do aumento na concentração da protease. D - Relação entre a massa molecular teórica predita para a sequência primária restante após a clivagem da interface entre os dois domínios.....	142
Figura 58 -	Resultado da purificação de <i>NgSPS2.CTD_(p.l.)</i> . As amostras eluídas durante a purificação foram avaliadas por eletroforese desnaturante. A região A do cromatograma corresponde às canaletas 10-13 no SDS-PAGE 15%. A região B corresponde as amostras numeradas de 14 a 16 e a faixa C é equivalente as canaletas 17 a 23. As colunas identificadas como M(kDa) no início do primeiro e do segundo gel referem-se ao padrão de massa molecular (97,4; 66,2; 45; 31; 21,5 e 15 kDa.....	144
Figura 59 -	Fotos das gotas utilizadas como modelo para a categorização da triagem inicial de cristalização. As imagens indicam, respectivamente, o padrão de uma gota limpa (2), precipitados amorfos (2.1 a 2.3) e microcristais, precipitados cristalinos ou início de nucleação (3)	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reagentes utilizados no preparo do meio de cultivo ATCC 1034 para manutenção in vitro dos trofozoítos de <i>N. gruberi</i> . O “*” para o tampão fosfato refere-se à descrição da tabela 2.....	60
Tabela 2 -	Reagentes utilizados no preparo da solução estoque do tampão fosfato “*” adicionado aos meios de cultivo ATCC 1034 e M7.....	60
Tabela 3 -	Reagentes utilizados no preparo dos tampões de lise RIPA e Laemmli. A sigla EDTA significa ácido etilenodiaminotetracético e SDS corresponde a dodecil sulfato de sódio.....	62
Tabela 4 -	Informações gerais para cada um dos experimentos de diferenciação celular. Os métodos 1 e 2 correspondem ao encistamento e 3 – 7.1 à exflagelação. Na última coluna, “Ref.” Corresponde à referência da qual o método foi adaptado.....	67
Tabela 5 -	Resumo de todos os experimentos de <i>Western Blot</i> realizados ao longo da pesquisa. Coluna 1 - numeração de cada experimento, coluna 2 – nome do anticorpo primário (1º Ac), titulação e tampão em que foi dissolvido, coluna 3 – objetivo do experimento e o tipo de amostra escolhida para análise do extrato proteico total, coluna 4 - item deste trabalho em que estão descritos os detalhes de cada experimento. Na segunda coluna, a sigla P.I. refere-se ao soro pré imune.....	69
Tabela 6 -	Indução de estresse celular. Série de testes realizados para definir a melhor concentração de H ₂ O ₂ . Os dois primeiros ensaios serviram de orientação para definir a faixa de H ₂ O ₂ selecionada no terceiro experimento.....	73
Tabela 7 -	Enzimas proteolíticas utilizadas no teste de proteólise limitada. Na tabela constam a solução tampão em que as enzimas foram diluídas, os sítios específicos de clivagem na cadeia peptídica e sua classificação dentre as famílias de proteases. O tampão A descrito na coluna 2 foi composto por 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0.....	82
Tabela 8 -	Kits comerciais utilizados para triagem inicial da cristalização de NgSPS2.CTD.....	88
Tabela 9 -	Resultado da contagem de células de três culturas diferenciadas a partir do método 2. A primeira coluna indica as três culturas utilizadas neste teste e, na sequência temos o número de células/ml e a porcentagem para os cistos e amebas.....	96
Tabela 10 -	Resultado da diferenciação celular para os cinco métodos de enflagelamento. A categoria escolhida para cada ensaio foi feita comparando-se as fotos obtidas e o padrão revelado na Figura 24 que deu origem aos três grupos A, B.1 e B.2.....	99
Tabela 11 -	Resultado da contagem de duas culturas diferenciadas a partir do método 4.1 com 20mM NaCl. A primeira coluna indica as duas garrafas utilizadas neste teste e, na sequência temos o número de células/ml e a porcentagem para as células enflageladas e ameboides.....	100
Tabela 12 -	Informações preditas para a sequência primária das proteínas recombinantes avaliadas pela ferramenta ProtParam (ExPASy). A primeira coluna apresenta a identificação das construções utilizadas durante a pesquisa e, na sequência estão o número de resíduos incluindo os resíduos de aminoácidos provenientes do sistema pET, a massa molecular teórica e o coeficiente de extinção molar (ϵ) inferidos. As siglas n.c., c.t. e p.l significam, respectivamente NgSPS2.CTD não clivada com trombina, clivada com trombina e pós clivagem com tripsina.....	119

Tabela 13 -	Parâmetros fornecidos pelo alinhamento local entre NgSPS2 e seis selenofosfato sintetases de microrganismos selecionados dentre todo o grupo alinhado. Na ordem estão os valores para o alinhamento com SelD de <i>Escherichia coli</i> , SPS2 e SPS1 humana, SelD de <i>Aquifex aeolicus</i> , SelD de <i>Leishmania major</i> e SelD de <i>Trypanosoma brucei</i> e SelD de <i>Methanococcus jannaschii</i>	120
Tabela 14 -	Relação entre a porcentagem de gotas limpas (1), precipitados em fase inicial (2.1), fase intermediária (2.2), fase final (2.3) e gotas com possível nucleação (3*) para cada Kit testado. A, B e C indicam, respectivamente, NgSPS2.CTD _(n.t.) , NgSPS2.CTD _(p.t.) e NgSPS2.CTD _(p.l.)	146

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região 3' não traduzida de mRNA
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AIRS, PurM	Aminoimidazol ribonucleotídeo sintetase
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
AMPCPP	Adenosina 5'-(α,β metileno)trifosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATSDR	Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CD	Dicroísmo circular, em inglês <i>Circular Dichroism</i>
CDD	Do inglês <i>conserved domain database</i>
CHAPS	(3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate)
CNPEM	Centro nacional de pesquisas em energia e materiais
Co	Cobalto
CSF	Líquido cefalorraquidiano, do inglês <i>Cerebral Spinal Fluid</i>
CVB	Vírus de Coxsackie
Cys	Cisteína
D.O.	Densidade óptica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EF-Sec	Fator de elongação da tradução para inserção de selenocisteína em eucariotos
GTP	guanosina-5'-trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranoside
JEH	Jakobids-Euglenozoans-Heteroloboseans
KCl	Cloreto de potássio
LB	Luria-Bertani
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrona
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	RNA transportador
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for biotechnology information
NP40	Nonil-fenoxi-poliétoxi-etanol
Nt	Nucleotídeos
ORF	Open Reading Frame
PAM	Meningoencefalite amebiana primária
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase, em inglês <i>polymerase chain reaction</i>
PDB	Do inglês protein data bank
PEG	Polietilenoglicol
PFAM	Protein Multiple Sequence alignments
Pi	Fosfato inorgânico
PLP	Pyridoxal 5'-fosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PSTK	O- fosfoseril tRNA Kinase
RNA	Ácido ribonucleico, em inglês <i>ribonucleic acid</i>
rpm	Rotações por minuto
S	enxofre
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de Poliacrilamida com SDS
Se	Selênio

Sec	Selenocisteína
SPS	Selenofosfato sintetase
tRNA	RNA transportador
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	<i>Naegleria spp.</i>	27
1.1.2	<i>Naegleria fowleri</i> e a meningoencefalite amebiana primaria (PAM)	32
1.1.3	<i>Naegleria gruberi</i>	35
1.2	De selênio à selenofosfato sintetase	36
1.2.1	Selênio	36
1.2.2	Selenoproteínas	39
1.2.3	Biossíntese de selenocisteína	41
1.2.3.1	Biossíntese de Sec em Bacteria	44
1.2.3.2	Biossíntese de Sec em Eukarya e Archaea	46
1.2.3.3	Biossíntese de Sec em <i>Naegleria gruberi</i>	48
1.2.4	Selenofosfato sintetase	49
1.2.4.1	Selenofosfato sintetase de <i>Naegleria gruberi</i>	53
2	OBJETIVOS	57
3	MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1	Cultura de <i>Naegleria gruberi</i>	59
3.1.1	Cultivo das células - obtenção e manipulação	59
3.1.2	Obtenção dos extratos proteicos de <i>N. gruberi</i>	61
3.1.3	Diferenciação celular	63
3.1.4	Anticorpos <i>antiNgSPS2.FL</i> e <i>antiNgSPS2.CTD</i>	67
3.1.5	<i>Western Blot</i>	68
3.1.6	Suplementação com selenito de sódio	70
3.1.7	Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	72
3.2	Análise da proteína selenofosfato sintetase de <i>N. gruberi</i>	74
3.2.1	Análise <i>in silico</i> e obtenção dos plasmídeos	75
3.2.2	Expressão das proteínas	76
3.2.2.1	Testes de expressão - <i>NgSPS2.FL</i>	76

3.2.3	Solubilização alcalina.....	77
3.2.4	Teste de solubilidade.....	78
3.2.5	Expressão e lise de <i>NgSPS2.CTD</i>	78
3.2.6	Purificação por cromatografia de afinidade.....	79
3.2.7	Clivagem de <i>NgSPS2.CTD</i> com trombina.....	80
3.2.8	Cromatografia de exclusão molecular – SEC.....	80
3.2.9	Proteólise limitada.....	81
3.2.10	Caracterização bioquímica e biofísica de <i>NgSPS2.CTD</i>	82
3.2.10.1	SEC - avaliação analítica.....	82
3.2.10.2	Eletroforese em gel nativo.....	83
3.2.10.3	Espectroscopia de dicroísmo circular – CD.....	84
3.2.10.4	Cristalização – estudo estrutural de <i>NgSPS2.CTD</i>	87
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	91
4.1	Naegleria gruberi: cultura, manipulação e ensaios imunoenzimáticos	91
4.1.1	Cultivo das Células.....	91
4.1.2	Diferenciação Celular.....	94
4.1.3	Obtenção dos extratos proteicos.....	101
4.1.4	Anticorpos <i>antiNgSPS2.FL</i> e <i>antiNgSPS2.CTD</i> e <i>Western Blot</i>	102
4.1.5	Avaliação comparativa de <i>NgSPS2</i> nas três formas de <i>N. gruberi</i>	105
4.1.6	Suplementação com selenito de sódio.....	108
4.1.7	Indução do estresse oxidativo.....	114
4.2.	Análises proteicas	118
4.2.1	Análise das proteínas <i>NgSPS.FL</i> e <i>NgSPS.CTD</i> – Bioinformática.....	118
4.2.2	Análise da proteína <i>NgSPS2.FL</i>	123
4.2.2.1	Expressão <i>NgSPS2.FL</i>	123
4.2.2.2	Solubilização alcalina.....	125
4.2.2.3	Cromatografia de afinidade.....	126
4.2.2.4	Teste de solubilidade – Variação no tampão de lise.....	127

4.2.3	Análise de NgSPS2.CTD.....	129
4.2.3.2	Eletroforese em gel não desnaturante - Gel nativo.....	134
4.2.3.3	Espectroscopia de dicroísmo circular – CD.....	135
4.2.3.4	Ensaio de proteólise limitada com NgSPS2.CTD _(c.t.)	138
4.2.3.5	Cromatografia de exclusão com NgSPS2.CTD _(p.l.)	143
4.2.3.6	Cristalização de NgSPS2.CTD _(n.t.) , NgSPS2.CTD _(c.t.) e NgSPS2.CTD _(p.l.)	145
5	CONCLUSÕES.....	149
6	PERSPECTIVAS.....	151
	REFERÊNCIAS.....	153

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Naegleria spp.*

Em 1899, F. Schardinger* (apud Jonckheere) descobriu uma ameba capaz de se transformar em flagelado e nomeou-a de *Amoeba gruberi*. Em continuidade às investigações deste microrganismo, em 1912, A. Alexeieff** (apud Jonckheere) sugeriu o gênero *Naegleria* e os estudos seguintes foram baseados em sua capacidade de diferenciação para fase flagelar.

¹ Contudo, as pesquisas com *Naegleria spp.* ganharam destaque quando amebas isoladas de fluido cérebro espinhal foram apontadas como causadoras de uma inflamação fatal no cérebro humano, meningoencefalite amebiana primária (PAM), conforme diagnosticados em 1968 com duas vítimas, uma nos EUA e outra na Austrália.²

O gênero *Naegleria* é composto por eucariotos unicelulares de vida livre que pertencem a classe dos protistas Heterolobosea, família Vahlkampfiidae, e foi agrupada em conjunto com Euglenozoans e flagelados Jakobids distantemente relacionados. As três classes constituem o antigo grupo denominado JEH, Jakobids-Euglenozoans-Heteroloboseans conforme indicado na figura 1.³⁻⁵

* SCHARDINGER, F. Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa* (Gymnamoeba) : *Amoeba gruberi*. Sitzb Kaiserl. Akademie der Wissenschaften in Wien, v.1, n. 108, p.713-734, 1899

** ALEXEIEFF, A. Sur les caractères cytologiques et la systématique des amibes du groupe limax (*Naegleria* nov. gen. et *Hartmannia* nov. gen.) et des amibes parasites des vertébrés (*Protamoeba* nov. gen.). Bulletin de la Société Zoologique de France, v.37, p.55-74, 1912.

Figura 1 – Seção da filogenia bayesiana concatenada de quatro genes (SS-dRNA, actina, α -tubulina, β -tubulina) evidenciando o posicionamento do grupo JEH em relação ao supergrupo Amoebozoa. Destacadas em vermelho temos *Naegleria gruberi* (JEH) e *Acanthamoeba castellanii* (Amoebozoa).

Fonte: Adaptada de TEKLE.¹⁰⁸

A classificação dos gêneros encontrados no grupo monofilético JEH foi feita a partir de um estudo baseado no alinhamento de sequências de resíduos de aminoácidos da proteína 24A (Rpl24A) da subunidade maior do ribossomo de 143 representantes de eucariotos. A partir deste estudo, observou-se que Rpl24A possui uma inserção única na sua sequência de aminoácidos no caso de representantes do grupo JEH (Fig. 2) e ausente nas sequências ortólogas de eucariotos.⁶

Figura 2 – Seção do alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Rpl24A evidenciando a inserção dos resíduos adicionais para os membros do grupo JEH (ressaltados em tons de cinza).

<i>Ustilago</i>	QRKIYPGKGRLV-----RGDNKVFRFVSS
<i>Saccharomyces</i>	GAKIYPGRGTLFV-----RGDSKIFRFQNS
<i>Acanthamoeba</i>	GYKIYPGHGRRYA-----RTDMKTFVFINA
<i>Dictyostelium</i>	EFKIYPARGMKFV-----RGDSKVVFHINT
<i>Tryp. brucei</i>	HFAVHPGHGRRYVP-FAFLSTKPVLTFARP
<i>Tryp. cruzi</i>	HFAVHPGHGRRYVP-FAFLSTKPVLTFARP
<i>Leishmania</i>	HFAVHPGHGRRYVP-FAFLSTKPVLTFSRP
<i>Euglena</i>	GLPVHPGHGKRFVP-TLVQSTRPVLTFTVA
<i>Sawyeria</i>	GVKIYPGHGLSYVPVSVQATRPVFKFFDQ
<i>Naegleria</i>	GYKIYPGHGVRYVPCTNVQSTRPVFTFVSR
<i>Reclinomonas</i>	GFRIWPGHGIRYVPCVNMQSTKLVPFINH
<i>Histiona</i>	GFRIWPGHGVRYVPCVNMQSIKLVYFPIIR
<i>Seculamonas</i>	GIKVYPGHGLRYVPTANMQSTKLVPFLSR
<i>Malawimonas</i>	GFKIYPGHGRRFI-----RGDSKLFQFLNS
<i>Giardia</i>	GRKILPGYGKRMS-----RHDVLLIFLNR
<i>Spironucleus</i>	GRQILPGYGKRFA-----KLDKSLVIFINR
<i>Trichomonas</i>	GHIHFHAGHGRVHI-----REDKHLMAFESR
<i>Cyanophora</i>	GYKIYPGHGMKFV-----RADNRSFMFVSS
<i>Porphyra</i>	GFRIYPGHGSRFI-----RVDGKSIVFANS

Fonte: Adaptada de RODRÍGUEZ.⁶

O grupo JHE possui outros caracteres que os distinguem dos domínios Bacteria e Archaea envolvidos na composição do citoesqueleto composto por microtúbulos e actina, diferenciações na replicação do DNA, maquinaria de transcrição, regulação da transcrição mediada por cálcio-calmodulina, e organelas endossimbióticas.³

Na natureza *Naegleria spp* podem ser encontradas em piscinas cloradas, lagos de água doce, águas termais, abastecimento doméstico de água, águas poluídas termicamente, esgoto, ar, sistemas umidificadores, solo, garganta, cavidade nasal humana e podem ser mantidas em cultura de células.⁵ Áreas de refrigeração de água de indústria contém a maior proporção de patógenos devido à alta incidência do termófilo *Naegleria fowleri*.²

Na maior parte do tempo as amebas *Naegleria spp.* são encontradas no estágio vegetativo, trofozoítos, porém sob alterações físico químicas prejudiciais que tornem o ambiente inóspito pode ocorrer a indução na diferenciação em flagelados ou cistos como formas de escape e resistência² conforme resumido na figura 3.

Figura 3 - Ciclo de vida de *Naegleria spp.*

Fonte: Adaptada de FULTON.⁷

Na forma amebóide as células têm formato de arredondado à irregular e representam o estágio vegetativo no qual ocorre alimentação, baseada na fagocitose de bactérias e matéria orgânica.⁸ A reprodução se dá por fissão binária e a divisão nuclear segue um padrão pró mitótico no qual o envoltório nuclear permanece intacto até a completa separação dos cromossomos.⁸⁻⁹ As células têm de 10-20 µm de diâmetro em média e o citoplasma contém numerosos ribossomos, mitocôndrias, vacúolos digestivos e contráteis, além de um nucléolo central bem definido.⁹

O fator limitante à transformação de *Naegleria* é, normalmente, a troca de íons inorgânicos entre a célula e o meio, ou a exposição à alta pressão hidrostática. Tais condições interferem na estrutura e atividade da membrana e afetam a distribuição iônica, promovendo as alterações morfológicas para as fases de cisto ou flagelar.⁹

Em laboratório, quando submetidas às soluções aquosas diluídas e baixa disponibilidade de nutrientes no meio, as células ameboides de *N. gruberi*, tendem a transformar-se em flagelares, apresentando dois característicos flagelos que auxiliam na dispersão por ambientes aquáticos.⁷ Nesta fase, o citoplasma é denso em ribossomos, possui

traços de retículo endoplasmático, contêm um núcleo único com um grande nucléolo. O sistema de motilidade baseia-se em micro filamentos de actina e normalmente são vistos dois flagelos, porém 3, 4 ou mais flagelos podem ser ocasionalmente formados.⁹

Os flagelados medem entre 10 - 16 μm ⁹ e se locomovem de 50-100 $\mu\text{m}/\text{min}$ em temperaturas próximas a 25 °C.⁷ A fase flagelar é transiente e não ocorre divisão celular ou alimentação. Concomitante às alterações na morfologia celular, ocorrem modificações na síntese de organelas evidenciando o aparecimento das organelas do aparato flagelar e as proteínas dos corpos basais começam a ser sintetizadas, resultando na formação da estrutura centriolar do flagelo.⁵

Estudos revelaram que, aproximadamente após 100 minutos expostas a ambientes sem disponibilidade de nutriente, a diferenciação para flagelares leva à completa troca do sistema de motilidade, baseado inicialmente em actina, para um sistema controlado por tubulina, dependente da quantidade de cálcio livre na célula via regulação por calmodulinas.¹⁰

Ao serem submetidas a condições adversas, quando a oferta de alimento é escassa ou o ambiente se torna seco, ocorre diferenciação das formas ameboides para uma forma de resistência, conhecida como cisto.⁹ A transição para a forma de cistos envolve o arredondamento celular, desaparecimento do vacúolo contrátil, reorganização do citoplasma e surgimento de uma parede externa, além da diminuição do nucléolo. Os níveis respiratórios caem a níveis negligenciáveis, ocorre diminuição da atividade enzimática, bem como degradação da estrutura fina observada nas mitocôndrias.¹¹ As células de cisto possuem de 8 – 12 μm e contêm poros na parede celular dupla que são utilizados para o desencistamento quando as condições ambientais tornam-se favoráveis.⁹

Em laboratório, a eclosão ocorre em resposta ao aumento parcial na pressão de CO_2 , pois o gás promove o influxo de água no interior celular alterando o fluxo osmótico.¹¹ Nesta fase os densos grânulos citoplasmáticos voltam a aparecer e evidenciam-se os vacúolos contráteis, além do início do movimento ameboide pela emissão dos pseudópodes a partir dos poros, de aproximadamente 0,6 μm , na parede celular.⁷

Dentre as espécies mais bem investigadas do gênero *Naegleria*, destacam-se *N. fowleri*, *N. australienses*, *N. lovaniensis*, *N. gruberi*, *N. italica*, *N. jadini* e *N. thorntoni* que diferem na morfologia dos cistos, tolerância à temperatura, patogenicidade e padrões enzimáticos.² No total são 47 espécies² e três delas, *N. fowleri*, *N. australienses* e *N. italica*, são agentes patogênicos, apresentando características imunogênicas e bioquímicas distintas.¹² *N. fowleri* é causadora da Meningoencefalite Primária Fatal (do inglês, *Primary Amebic Meningoencephalitis* - PAM) em humanos e camundongos.¹ *N. australienses* é responsável

pela infecção subaguda, conhecida como meningoencefalite focal, no sistema nervoso central de camundongos, apresentando virulência inferior à de *Naegleria fowleri*.^{1,5}

A presença de *N. australiensis* foi reportada em cérebro de peixes e os trofozoítos foram isolados para análise gênica.¹³ *N. itálica* foi identificada a partir de um estudo que avaliou 17 bacias termais na Itália e, utilizando camundongos para teste de patogenicidade, confirmaram que os trofozoítos acometem o sistema nervoso central e apresenta virulência intermediária entre *N. fowleri* e *N. australiensis*.¹² Nenhuma das duas espécies *N. australiensis* ou *N. itálica* foram observadas em cérebro humano, ao contrário de *N. fowleri*.¹

1.1.2 *Naegleria fowleri* e a meningoencefalite amebiana primária (PAM)

Detectada a primeira vez em 1968, na Austrália, PAM é uma infecção adquirida via intranasal durante a natação em leitos de água doce ou pela inalação de cistos, durante tempestade de poeira.¹⁴ Embora a maior ocorrência da doença seja nas regiões tropicais, a maioria dos casos humanos diagnosticados provêm das regiões subtropical ou zona temperada devido às melhores políticas públicas que permitem a diagnose de PAM, além de menor incidência das diversas infecções típicas de regiões tropicais que confundem o diagnostico diferencial clínico.⁴

Dentre as 235 vítimas diagnosticadas com PAM, no mundo todo, desde 1962 até 2011, apenas 5% sobreviveram.² Uma representação mundial para a epidemiologia foi proposta em 2011 e envolve os países indicados na figura 4.

Figura 4 - Mapa com a distribuição das vítimas identificadas com PAM entre 1962 e 2009 ao redor do mundo. A numeração em cada país designa o número de casos.

Dentre as vítimas contabilizadas na figura 4 merecem destaque os seguintes casos: Dentre os 17 relatos da infecção no Paquistão 13 deles ocorreram em uma mesma cidade no período de 17 meses, entre 2008 e 2009.¹⁵ Curiosamente, as vítimas não tiveram históricos de atividades aquáticas e, após investigações ambientais, os pesquisadores sugeriram que o aumento repentino na incidência de PAM pode ter associação com níveis reduzidos de cloro na água potável, aumento da temperatura da água e situações precárias de distribuição hídrica aos habitantes de Karachi, Paquistão.¹⁵ Este fato é preocupante pois indica que, sob em um curto período de tempo, o agente etiológico tem potencial para ser disseminado em decorrência de mudanças ambientais.²

Por sua vez, na América do Sul foram relatados 7 casos na Venezuela e 5 no Brasil, cujas infecções foram adquiridas pelo contato com água não tratada.² Dentre as 111 vítimas infectadas desde 1962 a 2008 nos EUA, segundo os dados do Centro de Controle de Prevenção e Doenças, somente três pessoas sobreviveram.¹⁶

A porta de entrada para *N. fowleri* no hospedeiro humano é a inalação acidental dos trofozoítos ou flagelados presentes em água doce, fontes de águas poluídas, águas geotermas aquecidas subterrâneas, ou cistos através de tempestades de poeira.¹⁶ Trofozoítos de *N. fowleri* penetram no neuroepitélio olfatório humano, passam pelos bulbos olfativos localizados na lâmina crivosa nasal e atingem o lobo frontal do cérebro provocando inflamações que podem levar a necrose hemorrágica no bulbo olfatório e córtex cerebral¹⁶ assim como proposto na figura 5.

Figura 5 - Ciclo de vida de *N. fowleri* incluindo passagem pelo hospedeiro humano.

Fonte: Adaptada de MARTINEZ.⁹

Em estágios iniciais, os sintomas surgem de 1-7 dias após a infecção por *N. fowleri* e se assemelham às meningites bacterianas, com quadro de dores de cabeça, febre, náuseas, vômito, anorexia, e sinais de irritação meníngea.¹⁶ Conforme as amebas se alimentam do tecido cerebral, a proliferação avança, acometendo todo o sistema nervoso central e, nos estágios mais avançados, surgem perda de atenção, desequilíbrio, alucinações e convulsão.¹⁷⁻¹⁸ Normalmente, de 3 a 7 dias após o início dos sintomas a vítima é levada à morte.¹

Neste cenário, justifica-se a importância de diagnosticar rapidamente os casos de PAM para que os quimioterápicos possam exibir alguma eficácia.¹⁹ A alta taxa de mortalidade é explicada por diagnósticos tardios, falta de compreensão completa da patogênese e fisiopatologia da doença, ausência de drogas eficazes para o tratamento e dificuldade de conduzir os medicamentos até o cérebro de forma não invasiva.²⁰

Os diagnósticos de PAM geralmente são tardios devido a semelhança dos sintomas com meningoencefalites bacterianas e por requerer um método invasivo de diagnose baseado na coleta de fluido cefalorraquidiano (CSF, do inglês *Cerebral Spinal Fluid*) via punção lombar.²⁰

Os tratamentos associados à PAM envolvem uma combinação de fármacos aplicados por ingestão intravenosa ou intratecal assim que a infecção se estabelece e a doença é diagnosticada.¹⁹ Dentre eles, anfotericina B, rifampicina, miconazol, miltefosina (embora não aprovada no Brasil), fluconazol, e manitol são os mais utilizados.¹⁹ Devido ao aumento drástico na pressão intracraniana com o avanço da infecção cerebral, o uso de manitol é incluído na quimioterapia para combater este efeito.¹⁹

Contudo, anfotericina B e miltefosina têm sido sugeridos como os medicamentos mais eficazes para o tratamento de PAM¹⁹ ainda que, assim como os diversos medicamentos utilizados, apresentam efeitos colaterais neurotóxicos e por isso têm sido fabricados em conjunto com aditivos a fim de minimizar a toxidez e aumentar a eficácia evitando sua diluição até atingirem o local da infecção.²¹⁻²²

Em adição às dificuldades em diagnósticos e tratamentos eficientes para PAM, soma-se a preocupação com o aumento na incidência de *N. fowleri* e a elevação da temperatura.²³ Embora esta correlação não esteja comprovada, a problemática deve ser considerada devido à tolerância deste patógeno termofílico a altas temperaturas, o que tem potencial para aumento significativo caso o cenário climático no mundo enfrente episódios de aquecimento ambiental tornando a proliferação de *N. fowleri* uma ameaça.²³

1.1.3 *Naegleria gruberi*

O eucarioto unicelular heterotrófico de vida livre está no planeta há mais de um bilhão de anos. Foi a primeira espécie do gênero *Naegleria* a ser descoberta e, dentre as nomenclaturas inicialmente utilizadas, estão “*Amoeba gruberi*”, “*Dimastigamoeba gruberi*”, “*Vahlkampfia tachypodia*” e “*Trismatigamoeba*”.⁵ Atualmente a nomenclatura definida para a espécie é *Naegleria gruberi* sendo a espécie mais utilizada do gênero para estabelecimento da biologia molecular envolvida na diferenciação entre as formas amebóide, flagelar e cística⁵ além de ter sido validada como modelo de estudo para a espécie patogênica intimamente relacionada *N. fowleri*.³⁸

A partir de 2010 com o sequenciamento do genoma de *N. gruberi*, cepa NEG-M (ATCC30224) em cultivo axênico/homogêneo, foram identificados 15727 genes codificadores de proteínas associadas ao movimento celular, sinalização, metabolismo energético, reprodução e diferenciação que justificam a capacidade de *N. gruberi* à adaptação e sobrevivência sob ampla diversidade ambiental.³ O protozoário assexuado é conhecido também por sua rápida diferenciação para a forma flagelar, que ocorre em menos de 1,5 hora.³

A elucidação do genoma de *N. gruberi* envolveu a análise de 32811 sequências ESTs, etiquetas de sequências transcritas, comparadas por identidade com o genoma já sequenciado de 17 exemplares dos seis subgrupos eucariotos. Este estudo sugeriu conjuntos de genes compartilhados entre *N. gruberi* e um possível ancestral eucarioto, demonstrando sua posição basal na história evolutiva do grupo.³

Além disso foram encontrados genes que sugerem flexibilidade metabólica tanto para respiração aeróbica como metabolismo anaeróbico ainda que os exemplares da espécie sejam encontrados, com maior frequência, em ambientes aeróbicos e microaeróbicos de água doce e solos húmidos ao redor do mundo.³ O metabolismo aeróbico baseia-se na oxidação de glicose, aminoácidos e ácidos graxos via ciclo de Krebs em conjunto com a cadeia respiratória mitocondrial, utilizando oxigênio como receptor de elétrons.

De modo alternativo estão as estratégias de anaerobiose que incluem as reações de fosforilação a nível de substrato, ativação dos genes para a proteína Fe-hidrogenase e seu sistema de maturação, além do uso de fumarato como aceptor de elétrons. Por isso, *N. gruberi* é capaz de contornar a hipóxia intermitente característica de ambientes enlameados a partir do uso, em paralelo, do metabolismo aeróbico e anaeróbico.³

Apenas 1% dos genes sequenciados de *N. gruberi* apresentaram similaridade exclusiva com proteínas de Bacteria ou Archaea.³ Das 4133 famílias de genes catalogadas para o

possível ancestral eucarioto a partir do estudo genético de *N. gruberi* e demais genomas, foi revelado que a ameba compartilha 2994 destas famílias gênicas enquanto, em comparativo, 1709 genes mostraram-se conservados com *Trypanosoma cruzi*, representante da classe Euglenozoa no grupo JEH.³ Este fato atribui ao genoma de *N. gruberi* importância evolutiva por ser uma fonte potencial de análise de conservação gênica entre as linhagens eucarióticas.³

A identidade de sequências encontradas para *N. gruberi* e o ancestral comum eucarioto reflete diversidade gênica associada à sinalização celular, metabolismo de DNA e RNA, capacidade de diferenciação entre ameboides, flagelares e cistos indicando flexibilidade metabólica para adaptação sob diferentes condições ambientais.³ Deste modo, foi apontado o surgimento precoce de características derivadas, próprias de eucariotos mais complexos, conservadas também no genoma de *N. gruberi*, o que afirma seu potencial comparativo para as correlações evolutivas.³

1.2 De selênio à selenofosfato sintetase

1.2.1 Selênio

O elemento químico selênio é caracterizado como um metal, pertence à família dos calcogênios na tabela periódica, e foi identificado em 1817 pelo químico Jons Jacob Berzelius. Estudos revelaram suas propriedades antioxidante, terapêutica, quimiopreventiva, anti-inflamatória e anti-viral.²⁴

Segundo levantamento feito pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) em artigo publicado em 2003, a ocorrência natural de selênio na natureza está associada a rochas contendo sulfeto de prata, cobre, chumbo ou minerais de níquel combinados ao selênio. Intemperismo de rochas e solos contribuem para os níveis de selênio encontrados em águas, o que leva a sua assimilação por plantas, ou sua dispersão através de partículas de poeira.²⁵

Inicialmente o selênio foi associado ao seu alto potencial tóxico, mas, trabalhos pioneiros realizados em 1954 o relacionaram com a síntese de enzimas antioxidantes em *Escherichia coli*.²⁶ Schwartz e Foltz²⁷ confirmaram as propriedades de selênio como um micronutriente benéfico a partir do enriquecimento de selenocompostos na dieta de ratos deficientes em vitamina E cujo resultado foi o aumento na prevenção de necrose no fígado.²⁷⁻

Dentre as atribuições de selênio como tendo função antioxidante destacam-se as selenoenzimas, como glutathione peroxidases, que atuam na detoxificação de peróxido de hidrogênio ou reversão nos efeitos da oxidação de lipídios causados por espécies reativas de oxigênio.²⁹ Estudos realizados com selenoproteínas e compostos de selênio de menor massa molecular revelaram que a entrada diária de selênio da ordem 200 µg/dia/pessoa conduz a diminuição nos índices de duplicação de células cancerosas e auxilia na prevenção do câncer.³⁰⁻³¹

Através dos alimentos, da água ou do ar somos expostos ao selênio em diferentes níveis de acordo com a dose, duração e o tipo de contato. Níveis adequados do micronutriente na dieta, tomando como base a média americana, variam de 71 - 152 µg/pessoa/dia.²⁵ Grande quantidade do que é ingerido deixa o corpo dentro de 24 horas através da urina ou fezes na forma de trimetilselenônio, $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$, ou pela respiração na forma volátil selênio de dimetila, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$.^{25,32}

A absorção do selênio via alimentação se dá pela ingestão de vegetais, que contém selenometionina, animais, que contêm selenoproteínas, ou pela ingestão dos compostos orgânicos selenato e selenito.³² Dentre as principais fontes de selênio proveniente dos alimentos destacam-se os grãos e legumes cultivados em solo rico em Se, frutos do mar, carne, produtos lácteos e nozes.²⁹

Quanto às formas de armazenamento, ocorre através do aminoácido selenometionina armazenado em rins, fígado, pâncreas, coração e músculo esquelético. Por reação de trans-sulfuração, ocorre a catálise de selenometionina e consequente liberação de selenocisteína.³³ Uma via alternativa de armazenamento de Se é incorporado à selenoproteínas encontradas no fígado, tais como glutathione peroxidase.³³

Alguns casos específicos de deficiência do micronutriente na dieta humana podem provocar patologias associadas à miopatia cardíaca (doença de Keshan), miopatias de músculos esqueléticos, anemia macrocítica ou osteoartrite endêmica (doença de Kashin-Beck).^{24,34} Além destas, sabe-se que a deficiência do micronutriente na dieta resulta na diminuição das selenoproteínas o que prejudica os processos biológicos por elas mantido podendo aumentar o risco de câncer³⁰, cretinismo endêmico mixedematoso, diminuir a atividade do sistema imune e da função da tireoide, infertilidade masculina³⁵, além de doenças neurológicas como Parkinson e Alzheimer.³⁶⁻³⁷

Assim como o déficit de selênio está associado aos problemas de saúde, seu excesso também apresenta malefícios à homeostase celular. Diversos estudos correlacionaram altas doses de selenocompostos com seu efeito pró oxidativo na catálise de grupos tiol resultando

na formação de radicais superóxido.^{28, 41} Pesquisas realizadas com células de defesa, em mamíferos, correlacionam o aumento da produção de selenoproteínas antioxidantes em resposta ao aumento de selênio na dieta.²⁹ A tolerância à citotoxicidade de selênio deve-se, dentre outros, a sua taxa de excreção dependente da metilação das formas tóxicas de Se.²⁸

A incorporação co-traducional de Se em proteínas na forma de selenocisteína (Sec, U) reforça seu caráter essencial.²⁸ Selenocisteína difere do aminoácido canônico cisteína (Cys, C) apenas pelo átomo selênio constituinte do grupo selenol na cadeia lateral do aminoácido ao invés do átomo de enxofre (S) no grupamento tiol presente em Cys, conforme mostrado na figura 6.

Figura 6 - Representação dos aminoácidos cisteína e selenocisteína com evidência para os elementos S e Se de cada grupo lateral.

Fonte: Elaborada pela autora.

A diferença entre Cys e Sec está associada à alta reatividade catalítica de Sec comparada Cys devido ao maior caráter nucleofílico do grupo seleneto (RSe⁻) em reações químicas.⁴²

Considerando o pKa de aproximadamente 5,2 para o selenol comparado ao pKa ~ 8,3 para o tiol, em pH ~ 5, a proporção seleneto (RSe⁻) / selenol (RSeH) é de 1:1, comparado a 1:1000 tioleto (RS⁻) / tiol (SH).⁴² Desta forma as reações baseadas no enxofre do tiol são mais lentas comparadas ao seleneto como nucleófilo.⁴²

Em pH fisiológico ($\pm$ 7,4) o grupo selenol se encontra ionizado e apresenta alta reatividade comparado ao grupo tiol, que estará protonado.⁴³ Estes fatores explicam a menor reatividade dos homólogos de selenoproteínas contendo Cys no sítio ativo.^{43,24,36}

1.2.2 Selenoproteínas

Desde a identificação inicial da primeira selenoproteína, denominada formato desidrogenase⁴⁴ a identificação de novas selenoproteínas têm aumentado anualmente.

A disponibilidade do selênio no meio interfere diretamente na composição do selenoproteoma, conjunto de selenoproteínas em um dado proteoma. Um exemplo é o elevado número de selenoproteínas, 30 a 37, encontradas em algas verdes e azuis devido a disponibilidade de selênio na água do mar resultando na necessidade de um sistema de reparo/proteção celular contra níveis de oxigênio.⁴⁵

Análises de sequência gênica revelaram que, em um mesmo domínio, Eukarya, Archaea ou Bacteria, podem existir espécies com mais de 25 selenoproteínas e outras espécies que perderam completamente a maquinaria de inserção de Sec.⁴⁵⁻⁴⁶ Análises de alinhamento múltiplo de sequências gênicas revelaram 25 famílias de selenoproteínas para Bacteria, incluindo glutathione peroxidases, tioredoxinas, prolina redutases e selenofosfato sintetase, entre outras.⁴⁷⁻⁴⁸

Quanto ao domínio Archaea, dos 43 gêneros identificados até o momento, apenas dois contêm selenoproteínas em seu genoma. Dentre as seis selenoproteínas descobertas destacam-se: formato desidrogenase, Formil Metano Furano Desidrogenase (FMD), heterodissulfeto redutase e selenofosfato sintetase.²⁶

O selenoproteoma de Eukarya varia da ausência de selenoproteínas em vegetais superiores e fungos à 30 em algas e peixes. Em mamíferos foram encontrados 25 selenoproteínas em humanos e 24 em roedores. Estudos revelam que os demais representantes do grupo contêm selenoproteoma muito similar ao humano.⁴⁵

O selenoproteoma de um eucarioto primitivo, a ameba de solo *Dictyostelium discoideum* do grupo Amoebozoa, revelou cinco selenoproteínas incluindo SPS2, SelK, Sep15, uma selenoproteína predita de membrana (MSP) e uma deiodinase. Todas foram identificadas por conservação da sequência de aminoácidos e apresentam similaridade à homólogas de outros eucariotos.⁴⁵

Estudos comparados das selenoproteínas de plantas, mamíferos e eucariotos unicelulares sugerem que o selenoproteoma evoluiu de um ancestral comum aos animais e plantas. Entretanto, debates incluem a possibilidade de evolução independente em mamíferos e algas ou aquisição de selenoproteomas semelhantes através de transferência horizontal de genes. Não havendo ainda um consenso sobre esta questão, há a necessidade em prosseguir as investigações.⁴⁵

Dentre as diversas famílias de selenoproteínas com função caracterizada seguem alguns exemplos do papel biológico que podem desempenhar:

- Formato Desidrogenase (FDH): presente em várias espécies de Bacteria e Archaea diferem na composição de aminoácidos e tipo de aceptores de elétron. A função desempenhada se resume na oxidação reversível de formato à CO_2 com liberação de elétrons que serão utilizados para a fermentação de aminoácidos. O CO_2 produzido poderá servir também para a fixação de carbono e homeostase de pH.⁵⁰
- Metionina sulfóxido redutase (Msr): presente principalmente em bactérias e algumas algas verdes. Promove a redução dos resíduos de metionina oxidados na sequência de proteínas. A oxidação da metionina é proveniente da ação de espécies reativas de oxigênio.²⁶
- Selenofosfato sintetase (SPS, SelD, do inglês *selenide water dikinase*): Envolvida na reação de transferência de um grupo gama fosfato de ATP (adenosina-5'-trifosfato) para uma espécie reduzida de selênio liberando AMP e ortofosfato. É a única enzima envolvida na via de biossíntese de Sec que, em alguns organismos, é uma selenoproteína.⁵¹ Selenofosfato sintetases que contêm Sec ao invés de Cys foram identificadas em Eukarya (genoma humano e de ratos), Archaea (*Methanococcus jannaschii*) e Bacteria (*Haemophilus influenzae*).⁵² Porém, em eucariotos foram identificadas sequências de selenofosfato sintetase que não apresentam nem cisteína, nem selenocisteína no códon UGA e, portanto foram classificadas como SPS1. Estas, por sua vez, não atuam na síntese de selenoproteínas.⁵¹
- Formil metano furano desidrogenase (FMD): Em Archaea participa da reação de metanogênese que representa a maior fonte de energia para estes microrganismos e consiste em uma série de reações de redução envolvendo CO_2 e H_2 até a formação de metano, essencial ao ciclo global de carbono.⁴⁹
- Glutationa Peroxidase (GPX): primeira selenoproteína identificada em mamíferos e outros vertebrados superiores além de ter sido reconhecida também no genoma de platelmintos como *Schistosoma mansoni*.⁵³ GPXs utilizam o selênio (ou enxofre) presente em seu sítio ativo para detoxificar as espécies reativas de oxigênio incluindo peróxido de hidrogênio e protegem a célula contra danos oxidativos.²⁹ Proteínas homólogas exercendo a mesma função, porém com a mutação de Sec para Cys foram identificadas também em plantas e bactérias.⁵³
- Tioredoxina Redutase (Trx): está envolvida na regeneração da tioredoxina reduzida atuando na redução de pontes dissulfeto. Trx auxilia no balanço redox no interior das células.²⁹ Em mamíferos por exemplo uma tioredoxina reductase (Txnrd1) foi caracterizada

como reguladora indireta dos efeitos provocados por H_2O_2 devido seu papel na redução nas pontes dissulfeto formadas por esta espécie reativa de oxigênio.²⁹

Tanto glutathiona peroxidase como tioredoxina redutase tiveram seus níveis de expressão aumentados pela análise de células T (células de defesa) em ratos alimentados com alto teor de selênio na dieta o que confirma o potencial antioxidante de ambas selenoenzimas.²⁹

A produção das selenoproteínas envolve a síntese do aminoácido selenocisteína e sua inserção na sequência peptídica a partir de maquinarias de tradução específicas para Bacteria, Eukarya e Archaea.

1.2.3 Biossíntese de selenocisteína

Devido à descoberta de dois novos aminoácidos, o código genético foi ampliado para 22 com a inclusão de selenocisteína (Sec) e pirrolisina (Pyl). Esses aminoácidos são incorporados co-traducionalmente nas proteínas em posições especificadas pelos códons UGA e UAG, respectivamente, os quais são normalmente reconhecidos como códon de terminação.⁵⁴

A presença de Sec em proteínas foi detectada pela primeira vez em 1986 através de duas pesquisas paralelas que identificaram uma glutathiona peroxidase de mamíferos e uma Formato Desidrogenase de Bacteria. Em ambos os casos a posição da selenocisteína coincidia, no DNA, com o códon TGA.⁴⁴

Dentre os requisitos necessários para a biossíntese de selenocisteína encontram-se três principais fatores: presença do códon UGA em fase aberta de leitura no mRNA, um tRNA específico denominado $tRNA^{[Ser]Sec}$ que fará o reconhecimento do códon UGA e uma estrutura secundária em forma de grampo no mRNA denominada *Seleno Cystein Insertion Sequences* (SECIS).⁴⁴

O $tRNA^{[Ser]Sec}$ apresenta características adicionais em relação aos tRNAs canônicos que possuem um perfil de enovelamento tipo 7/5, incluindo 7 pares de base (pb) no braço aceptor, 5 pb no braço T e 3 a 4 pb no braço D (Fig. 7A). O $tRNA^{[Ser]Sec}$ possui dois diferentes modelos: o padrão 8/5 típico de Bacteria formado por 95 nucleotídeos, 8 pb no braço aceptor, 5 pb no braço T, 6 pb no braço D e cerca de 22 nucleotídeos no braço variável (Fig. 7B) e o padrão 9/4 típico de Eukarya e Archaea com 90 a 93 nucleotídeos, 9 pb no braço aceptor, 4 pb

no braço T e 6 pb no braço D além de um nucleotídeo modificado 5-metilcarboximetiluridina-2'-*O*-metilribose (mcm⁵Um) na região do anti códon para Eukarya⁴⁴ (Fig. 7C).

Estudos prévios em nosso grupo de pesquisa, através de análises *in silico* com o servidor *tRNA scan search*, propuseram a estrutura secundária do tRNA^{[Ser]Sec} de *Naegleria gruberi* composto por 87 nucleotídeos, e 9 pares de base no braço acceptor do aminoácido, 4 pb no braço T e 6 pb no braço D, além de 16 nucleotídeos no braço variável (Fig.7D).

Figura 7 - Estrutura secundária de um tRNA canônico (A), tRNA^{[Ser]Sec} típico de Bacteria (B), tRNA^{[Ser]Sec} de Archaea e Eukarya (C) além do tRNA^{[Ser]Sec} identificado para *N. gruberi* (D). O círculo vermelho nos três últimos modelos indica o anticódon UCA complementar ao códon UGA do mRNA de Sec.

Fonte: Adaptada de ALLMANG.⁵⁵; SILVA.⁵⁶

O aminoácido selenocisteína é o único cuja síntese ocorre em seu próprio tRNA. Os demais aminoácidos são sintetizados anteriormente para depois serem incorporados no respectivo tRNA.⁴⁴

A distinção de UGA como códon de inserção de selenocisteína e não como códon de parada deve-se à presença de uma região específica no 5' terminal do DNA composta por repetições CG que promovem o enovelamento característico denominado SECIS no mRNA transcrito.⁵⁴

Em Eukarya e Archaea o SECIS se localiza na região 3' não traduzida do mRNA (3' UTR).⁴⁴ O elemento SECIS típico de Eukarya foi subdividido⁵⁵ em duas formas: o tipo II apresenta um mini braço adicional após a segunda hélice e o tipo I não possui o mini-braço conforme ilustrado na figura 8, A e B.

Análises comparadas entre o selenoproteoma de vertebrados, invertebrados e algas verdes revelaram maior incidência do elemento SECIS tipo II em Eukarya. A vantagem funcional

associada ao mini-braço pode estar relacionada à estabilidade da região terminal de SECIS e facilidade em aproximar-se do códon UGA na fase aberta de leitura.⁵⁵

Estudos baseados na mutação em pontos específicos do elemento SECIS sugerem a presença de nucleotídeos consenso na estrutura de SECIS que são essenciais para incorporação de Sec, *in vivo*, dos quais têm destaque: duas adeninas, ou citosinas, não pareadas na volta apical, um quarteto de nucleotídeos que não apresenta interação Watson-Crick (A-T e C-G) na base da segunda hélice do SECIS e é precedido por outro resíduo conservado, adenosina, que pode ser substituída também por guanosina⁵⁵ (Fig.8 A-C).

Em Bacteria o SECIS possui aproximadamente 40 nucleotídeos e fica inserido na fase aberta de leitura, imediatamente após o códon UGA.⁵⁴ A estrutura apresenta 2 hélices, uma volta interna e uma volta apical com dois nucleotídeos não pareados Watson-Crick sendo um deles uma guanosina, G⁵⁴ (Fig.8D).

Figura 8 – Representação do elemento SECIS em Eukarya (A - forma I e B - forma II), Archaea (C), Bacteria (D) e *Naegleria gruberi* (E). Em A e B estão representados os nucleotídeos conservados incluindo AA (ou CC) na alça apical e o quarteto não Watson-Crick no ápice da primeira volta precedido pelo resíduo conservado A (ou G).

Fonte: Adaptada de LUKASHENKO⁵⁴ ; SILVA.⁵⁶

Considerando que o elemento SECIS, o tRNA^{[Ser]Sec} e o códon UGA, essenciais para inserção de Sec em selenoproteínas, não são suficientes para realizar toda a tradução, é preciso o recrutamento de uma maquinaria enzimática capaz de converter o aminoácido serina em selenocisteína e reconhecer o elemento SECIS e o códon UGA permitindo o pareamento do tRNA^{[Ser]Sec} no mRNA de selenoproteínas.⁵⁵

O início da incorporação de selenocisteínas apresenta o mesmo passo inicial para Bacteria, Archaea e Eukarya em que o $\text{tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ é aminoacilado com uma serina pela enzima seril-tRNA sintetase (Ser RS) e promove a formação de $\text{Ser-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$.⁵⁵ O $\text{Ser-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ é convertido a $\text{Sec-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ de duas maneiras diferentes e as etapas sequências divergem entre os domínios conforme detalhado adiante

1.2.3.1 Biossíntese de Sec em Bacteria

A produção e inserção de Sec em Bacteria contam com os produtos dos genes *selA*, *selB*, *selC* e *selD*.²⁴ Para a síntese de selenocisteína ocorre, inicialmente, a aminoacilação do $\text{tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$, produto de gene *selC*, pela SerRS com o consumo de ATP e é formado o seril- $\text{tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$. Na sequência, a selenocisteína sintase (SelA) dependente de piridoxal-5'-fosfato (PLP) catalisa a remoção do grupo hidroxil da cadeia lateral de serina e forma o intermediário aminoacrilil $\text{tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$. Este último atua como receptor de monoselenofosfato ($\text{H}_2\text{PO}_3\text{SeH}$), obtido graças à reação de catálise realizada pela enzima selenofosfato sintetase (SelD) dependente de ATP.²⁴ A figura 9 resume as etapas descritas até o momento.

Figura 9 - Biossíntese de selenocisteína em Bacteria. As enzimas destacadas em vermelho são responsáveis pela conversão de $\text{tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$ a $\text{Sec-tRNA}^{[\text{Ser}]\text{Sec}}$. SerRS representa a proteína seril-tRNA sintetase, SelA corresponde a selenocisteína sintase e SelD a selenofosfato sintetase.

Nesta etapa da via, o tRNA está carregado com uma selenocisteína e, para inserção no peptídeo nascente, será reconhecido pelo fator de elongação SelB homólogo a EF-Tu (fator de elongação da tradução) de aminoácidos canônicos, porém com uma extensão C-terminal adicional responsável pela ligação ao SECIS.²⁶ SelB possui uma molécula de GTP (guanosina-5'-trifosfato) ligada que auxilia na interação entre o complexo Sec-tRNA^{[Ser]Sec}, SelB e o elemento SECIS conforme figura 10.

Figura 10 - Incorporação de Sec – tRNA^{[ser]sec} no peptídeo nascente para formação de uma selenoproteína em Bacteria. SelB é o fator de elongação específico de selenocisteína e o elemento SECIS localiza-se adjacente ao códon UGA.

Fonte: Adaptada de STOCK.²⁶

A partir da hidrólise de GTP será desencadeada uma mudança conformacional em que SelB se desprende do complexo e permite o ajuste de Sec-tRNA^{[Ser]Sec} no centro A do ribossomo de modo que o anticódon UCA (tRNA) pareie corretamente com o códon AGU (mRNA) resultando na incorporação de Sec na cadeia polipeptídica.²⁴

1.2.3.2 Biossíntese de Sec em Eukarya e Archaea

De modo semelhante em Eukarya e Archaea, o passo inicial da via de síntese de Sec ocorre com a aminoacilação do $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ por SerRS, porém sua transformação em Sec - $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ requer passos adicionais diferindo da via em Bacteria.⁵⁷ A primeira divergência é a fosforilação de Ser- $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ pela quinase O-fosfo-L-seril-(PSer)- $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ (PSTK), em uma reação dependente de ATP.

Em seguida, a enzima Sep tRNA^{Sec} sintetase (SepSecS) catalisa a produção do Selenocisteil- tRNA^{Sec} (Sec- $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$) a partir do fosfoseril- $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ e monoselenofosfato, obtido pela ação de uma selenofosfato sintetase isoforma 2 (SPS2) a partir de ATP e seleneto.²⁶ SPS2 é homóloga a SelD de Bacteria. SepSecS também é uma enzima dependente de PLP, assim como SelA em bactérias²⁶ (Figura 11).

Figura 11 – Biossíntese de Sec em Eukarya e Archaea. Em vermelho estão indicadas as enzimas Seril tRNA sintetase (Ser RS), O-fosfoseril-tRNA_{Sec}-quinase (PSTK), O-fosfoseril-tRNA_{Sec} selenocisteína sintetase (SepSecS) e Selenofosfato sintetase (SPS2).

Fonte: Adaptada de STOCK.²⁶

A conversão de Ser- $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ para Sec - $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$, em etapa única (Bacteria) ou intermediada por um passo adicional (Eukarya e Archaea), requer monoselenofosfato

proveniente da ação de selenofosfato sintetase (SelD para bactérias e SPS2 para mamíferos)⁵⁷, (figuras 9 e 11).

Em Eukarya uma proteína de ligação ao SECIS denominada SECIS-binding protein 2 (SBP2) é responsável por recrutar para a maquinaria o fator de elongação EFSec (*Sec-specific elongation factor*) que auxilia na entrega de Sec-tRNA^{[Ser]Sec} ao centro de decodificação do ribossomo (Figura 12). Estudos sugerem que SBP2 participe de um complexo multimérico composto por EFSec, o elemento SECIS, Secp43 responsável por estabilizar a ligação EFSec-SBP2-SECIS²⁴ e auxiliar no reconhecimento do códon UGA²⁶, além de uma proteína ribossomal (L30) que parece aumentar a interação do complexo. Contudo, o modo de ação de Secp43 e L30 não é completamente conhecido.²⁴

Figura 12 - Modelo para inserção de Sec em proteínas de Eukarya. O elemento SECIS está localizado na região não traduzida (3'UTR) do mRNA das selenoproteínas. Em vermelho estão indicadas as enzimas SECIS-binding protein 2 (SBP2) e *Sec-specific elongation factor* (EFSec).

Fonte: Adaptada de STOCK.²⁶

A divergência na via de biossíntese de Sec entre Eukarya e Archaea encontra-se na etapa final de reconhecimento do SECIS e incorporação do Sec-tRNA^{[Ser]Sec} devido ausência

de qualquer fator responsável pela interação entre o EFSec, o ribossomo, o elemento SECIS e o Sec-tRNA^[Ser] em Archaea.⁵⁸

Embora não tenha sido reportada a presença de SBP2 em Archaea⁴⁸, três homólogos para a proteína ribossomal L30 foram identificados a partir do genoma do microrganismo modelo para o estudo da via, *Methanococcus jannaschii*.⁵⁸ Dentre as três putativas L30, a de maior similaridade com uma SBP2 de Eukarya foi escolhida para testes experimentais mas não demonstrou nenhuma função na síntese de selenoproteínas.⁵⁸ Portanto não se sabe ainda como é feita a comunicação entre o elemento SECIS e o códon UGA no sítio de tradução do ribossomo^{26,58} conforme proposto na figura 13.

Figura 13 - Esquema da última etapa da via de inserção de Sec em selenoproteínas de Archaea. A seta vermelha indica que o reconhecimento entre o elemento SECIS, o Sec-tRNA^{[Ser]Sec} carregado por EFSec e o ribossomo não está bem definido.

Fonte: Adaptada de ROTHER.⁵⁸

1.2.3.3 Biossíntese de Sec em *Naegleria gruberi*

Quanto às características específicas da maquinaria de Sec em *N. gruberi*, eucarioto primitivo, graças à identificação bioinformática feita por M.T.A. da Silva, et al (2013), foram encontrados genes que codificam para PSTK, SepSecS, SPS2, EFSec e SBP (o fator de alongação específico de selenocisteínas). Todos os genes foram confirmados por RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase) e sequenciamento indicando que a via está ativa em *N. gruberi*.⁵⁶

A partir da busca de selenoproteínas no genoma de *Naegleria gruberi* inicialmente foram feitas análises bioinformáticas alinhando selenoproteínas já descritas com o genoma de *N. gruberi* e então as putativas selenoproteínas tiveram suas ORFs avaliadas pelo programa SECISearch⁵⁹, destinado a busca por sequências consenso do elemento SECIS. Esta investigação resultou na identificação de uma possível selenoproteína tioredoxina redutase cujo SECIS está posicionado 122 pb a jusante do códon UGA, na região 3'UTR não traduzida.⁵⁶

O mecanismo de síntese de selenocisteína proposto para *N. gruberi* é homologa ao descrito em outros eucariotos (Figura 14).

Figura 14 - Maquinaria de inserção de Sec em *N. gruberi*.

Fonte: Adaptada de SILVA.⁵⁶

1.2.4 Selenofosfato sintetase

A enzima alvo deste estudo, selenofosfato sintetase (SelD / SPS), foi identificada no genoma de diversos microrganismos distribuídos nos três domínios de vida e exerce a função de doadora universal da forma ativa de selênio, monoselenofosfato (SeP), para a síntese de selenocisteína(Sec).⁵²

Pesquisas iniciais com selenofosfato sintetase de *Aquifex aeolicus* (AaSelD)⁶⁰ determinaram a primeira estrutura cristalográfica de uma selenofosfato sintetase e permitiram a classificação da proteína na superfamília das AIRS (aminoimidazol ribonucleotídeo sintetase, EC 6.3.3.1), também conhecida como PurM⁶¹, cuja reação catalítica utiliza ATP como substrato para a transferência do oxigênio do grupo carbonila para imina.⁶² O fosfato γ do ATP é utilizado para ativação do oxigênio da carbonila que atua como grupo de saída na molécula aceptora.⁶³

A composição do motivo conservado de ligação ao ATP (Fig. 15) é a principal característica que define o grupo das PurM e de três membros adicionais da superfamília: proteína de maturação Ni-Fe hidrogenase (Hype), selenofosfato sintetase (SPS) e tiamina fosfoquinase (ThiL).⁶³

Figura 15 - Sequência de aminoácidos conservados que definem a superfamília PurM. Estes resíduos, circundados em vermelho, são responsáveis pela ligação de ATP nas sequências utilizadas como modelo: PurM (*Escherichia coli*), PurL (*Thermotoga marítima*), ThiL (*Aquifex aeolicus*), SelD (*Aquifex aeolicus*) e HypE (*Escherichia coli*), respectivamente.

EcPurM	⁸⁴ G	x ₉	D	x ₄	G	A	E	P	x ₃₆	G	G	E ¹⁴¹
TmPurL	⁸⁹ G	x ₄	D	x ₄	G	A	R	P	x ₃₂	G	G	E ¹³⁷
AaThiL	⁶¹ G	x ₉	D	x ₄	G	G	L	P	x ₃₇	G	G	N ¹¹⁹
AaSelD	⁷³ G	x ₉	D	x ₄	G	G	I	P	x ₃₈	G	G	H ¹³²
EcHypE	⁷³ G	x ₉	D	x ₄	G	A	I	P	x ₃₇	T	G	D ¹³¹

Fonte: Adaptada de ZHANG.⁶³

Em especial, o resíduo aspartato (D) conservado em todas as proteínas agrupadas em PurM auxilia na ligação de Mg^{+2} , cofator responsável pela estabilidade da extensão fosfato do ATP.⁶³

Estudos baseados no alinhamento da sequência de membros da superfamília PurM revelaram a presença de dois domínios (AIRS para o N-terminal e AIRS_C para o C-terminal) para cada monômero e sugerem a conformação dimérica como essencial à atividade catalítica. A região N-terminal contém uma cadeia mista com quatro fitas β e quatro hélices α enquanto o domínio C-terminal apresenta seis fitas β e sete hélices α . A interface do dímero é formada, primariamente, pelos domínios N-terminais de ambos os monômeros resultando na formação

de oito folhas β organizadas como barril- β e o sítio ativo localiza-se na fenda entre N- e C-terminal de cada monômero⁶³ (Fig. 16A).

Para SPS de *Aquifex aeolicus*, a estrutura foi obtida a partir de um truncamento na região N-terminal⁶⁰ e, em um segundo trabalho a proteína inteira foi cristalizada em complexo com uma molécula de adenosina 5'-(α,β metileno)-trifosfato (AMPCPP).⁶² Ambos os estudos confirmaram os dois domínios N- e C-terminal com topologia α/β cujo enovelamento segue o padrão típico da superfamília PurM (Fig. 16B).

O sítio ativo de AeSPS também foi localizado na fenda entre os domínios C e N-terminal e um segmento flexível incluindo os 45 primeiros resíduos do N-terminal encobre o canal formado no sítio catalítico. Esta sequência flexível apresenta resíduos cruciais à atividade enzimática e a maioria dos aminoácidos não têm enovelamento definido exceto os que pertencem a curta hélice α ou a hélice do tipo 3_{10} como elementos de estrutura secundária⁶² conforme os segmentos rosa claro e rosa escuro da figura 16, B.

Figura 16 – Comparativo entre o enovelamento padrão de uma representante da superfamília PurM e uma selenofosfato sintetase. A - Estrutura dimérica de PurM de *E. coli* (PDB: 1CLI) demonstrando dois monômeros (um em azul e o outro em amarelo). B - dímero de SPS de *A. aeolicus* (PDB: 2ZOD). Em ambas as representações, entre o C-terminal e N-terminal de cada monômero encontra-se o sítio catalítico.

Fonte: Adaptada de ZHANG⁶³ e YTOH.⁶²

A figura 16 - B evidencia também a interface de dimerização da estrutura de *A. aeolicus* composta pela estrutura secundária barril β com o compartilhamento de 4 folhas β do domínio N-terminal de cada monômero compatível à superfamília PurM.^{61,62}

A região conservada para a ligação ao ATP localiza-se na porção N-terminal da interface do dímero e, através da estrutura de *A. aeolicus*, os resíduos dos aminoácidos Lys 16, Thr 221, Gly 222, Phe 223 e His 228 foram identificados como essenciais para a interação com os fosfatos α e γ de ATP, seja por ligações de hidrogênio ou interação de Van der Waals. Além destes, um conjunto conservado de quatro resíduos de aspartato (D44, D60, D83, D219) é considerado responsável por interagir com metais cobalto, *in vitro*, que representam Mg^{2+} , *in vivo*, e estes, por sua vez, estabilizam o fosfato gama de ATP.⁶² O resíduo de lisina 16 está localizada na volta N-terminal variável na região entre a curta hélice α e a hélice 3_{10} da sequência flexível e sua função também é coordenar o grupamento fosfato do ATP.⁶²

As sequências destacadas anteriormente são essenciais ao mecanismo de reação ATPásica de selenofosfato sintetases. Os resíduos conservados no sítio de ligação ao ATP estabilizam os três grupamentos fosfato de modo que α e β ficam internalizados na estrutura e o fosfato γ permanece exposto.⁶² Por isso, o mecanismo proposto para o primeiro passo da reação de SPS é o ataque nucleofílico do γ fosfato que será incorporado no produto monoselenofosfato, e β fosfato será utilizado para formação de ortofosfato.⁶²

O mecanismo da reação ocorre em duas etapas. Inicialmente o seleneto utilizado como substrato da reação se acomoda no sítio ativo entre o C e N-terminal de cada monômero.⁶² Porém, sabendo que a constante de Michaelis-Menten (K_m) para selenofosfato sintetase de *E. coli* na presença de seleneto, *in vivo*, é igual a $7,3\mu M$, valor próximo ao limiar de citotoxicidade, acredita-se que há uma proteína doadora de selênio que interage com SPS através de sua alça flexível N-terminal.⁶⁴ Para bactérias, proteínas NifS-like são propostas como as doadoras de seleneto à SelD e para eucariotos as homólogas são selenocisteína liases que possivelmente interagem com SPSs.⁶⁴

Feita a entrega de seleneto, o Se será reconhecido pelo resíduo catalítico Cys/Sec conservado do segmento N-terminal flexível (Fig. 17, passos A e B). Caso a enzima for uma selenoproteína, ocorrerá ligação covalente entre o Se de seleneto e o Se do resíduo Sec formando um grupamento perseleneto ($-Se-Se^-$). Por outro lado, se a enzima for uma homóloga Cys de SPS a ligação será selenosulfeto ($-S-Se^-$).⁶² A ligação perseleneto é mais facilmente formada do que selenosulfeto e isto contribui à predominância de selenofosfato sintetases contendo Sec ao invés de Cys dentre as SPS já identificadas.⁶²

Estudos de modelagem molecular sugerem que a acomodação de selenosulfeto no sítio ativo da enzima envolve a mudança conformacional no N-terminal rico em glicina durante a ligação de ATP. A região flexível N-terminal pode assumir duas posições distintas que dependem da mobilidade deste segmento.¹⁸ Para *A. aeolicus* o resíduo catalítico U,13 é capaz

de receber o substrato seleneto quando a sequência N-terminal flexível está “aberta” o que permite a formação de perseleneto ($-\text{Se}-\text{Se}^-$)⁶² (Fig. 17, A e B).

Em seguida, o segmento assume uma posição “fechada” no sítio catalítico e o Se é aproximado da região de ligação ao ATP para o ataque nucleofílico de γ fosfato⁶² e é formado o monoselenofosfato ligado à proteína⁶² (Fig. 17, B e C).

A segunda etapa da reação envolve a hidrólise do ADP, ainda presente no sítio de ligação, através do ataque nucleofílico por uma molécula de água que conduzirá a formação de AMP e ortofosfato (Fig. 17, D e E).

Figura 17 - Esquema do mecanismo catalítico de SPS. As letras A – E indicam as etapas propostas para a reação.

Fonte: Adaptada de YTOH.⁶²

O selenofosfato dissociado da proteína na etapa E (Fig. 17) estará pronto para ser doado à Sela (Bacteria) ou SepSecS (Eukarya), responsáveis pela incorporação de Se no Ser-tRNA ou fosfoseril-tRNA^{Sec}, respectivamente, para a formação de Sec-tRNA^{[Ser]Sec}.⁶²

1.2.4.1 Selenofosfato sintetase de *Naegleria gruberi*

Pela investigação *in silico* das enzimas envolvidas na biossíntese de Sec no genoma de *N. gruberi*, em 2013, foi descoberta uma sequência codificadora para selenofosfato sintetase

(NgSPS2).⁵⁶ Experimentos de amplificação por RT-PCR confirmaram que o gene predito é transcrito e foi revelada uma fase aberta de leitura que codifica uma proteína de 737 aminoácidos.⁵⁶

Análises de conservação de sequências identificaram dois domínios: um C-terminal típico de selenofosfato sintetases canônicas, semelhante à estrutura da família PurM descrita anteriormente, e um domínio N-terminal característico de metiltransferases⁵⁶ conforme ilustrado na figura 18.

Figura 18 – Representação dos dois domínios de NgSPS2.

Fonte: Elaborada pela autora

A região C-terminal de NgSPS2 possui identidade de sequência com selenofosfato sintetases de Bacteria e Eukarya apresentando 35% de identidade com SelD de *E. coli* [gi.331642368] e 13% com SPS2 de *Homo sapiens* [gi.15011844]. Estes dados mostram que a proteína está mais próxima evolutivamente da SelD bacteriana, o que levou aos autores sugerirem duas hipóteses: o gene pode ter sido obtido via transferência horizontal a partir de bactérias.⁵⁶

O domínio N-terminal possui identidade com metiltransferase de eucariotos, possuindo 22 e 21% de identidade com metiltransferase tipo 11 de *Nitrosomonas sp.* [gi.255063221] e *Gallionella ferruginea* [gi.251829040], respectivamente além de apresentar 22% de identidade com uma arsenito metiltransferase do procarioto *Rhodobacteraceae bacterium* [gi.254510744].⁵⁶ Todas as enzimas citadas são capazes de ligar S-adenosilmetionina envolvida em processos de detoxificação metabólico incluindo vias de metilação de selênio.³²

No metabolismo de selênio, as formas inorgânicas selenito e selenato são reduzidas a seleneto (H₂Se) pela ação da enzima glutationa redutase. O seleneto é capaz de interagir inespecificamente com proteínas e inativá-las, por isso é considerado o principal composto tóxico de selênio.³² Estudos revelaram que a metilação de seleneto no fígado utiliza S-

adenosilmetionina como doadora de metil para a formação de dimetil seleneto, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, um composto muito menos tóxico que, em humanos, é eliminado pelos pulmões.³²

Quadros de super exposição a selênio resultaram na depleção de S-adenosilmetionina e a subsequente reposição de metionina através da dieta reduziu os níveis de intoxicação por seleneto.³² Estas evidências permitem sugerir que o domínio N-terminal de NgSPS2, homólogo a metiltransferase, pode ter papel importante para a metilação/detoxificação de selênio.³²

Portanto NgSPS2 pode ser uma enzima bifuncional devido ação na via de síntese de selenoproteínas relacionada ao domínio C-terminal (SPS) em paralelo a capacidade de detoxificar seleneto acumulado na célula através da metilação pelo domínio N-terminal (metiltransferase). Estas inferências motivam a presente pesquisa com NgSPS2 baseada em uma abordagem celular para verificação do papel de ambos os domínios quando as células são cultivadas sob condições de estresse além da investigação *in vitro* da proteína para ampliar o conhecimento bioquímico e estrutural da mesma.

2 OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos a caracterização bioquímica e biofísica da selenofosfato sintetase (SPS) de *Naegleria gruberi* identificada anteriormente. Os objetivos específicos da pesquisa foram:

- I. Analisar a expressão da proteína NgSPS2 a partir do cultivo de *N. gruberi* em suas três formas de vida;
- II. Avaliar o efeito da suplementação de selênio no crescimento celular, inferindo mudanças na forma de vida e níveis de citotoxicidade e investigar o efeito na expressão de NgSPS2 quando a cultura é submetida a condições de estresse;
- III. Análises das proteínas recombinantes NgSPS2.FL(referente à proteína completa, “*full length*”) e NgSPS2.CTD (referente ao domínio C-terminal);
- IV. Caracterizar a proteína Ng.SPS2.CTD utilizando as técnicas de cromatografia de exclusão molecular analítica, eletroforese em gel nativo e espectroscopia de dicroísmo circular;
- V. Realizar testes de cristalização com NgSPS2.CTD e realizar ensaios de proteólise limitada como alternativa à obtenção de cristais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As metodologias aplicadas nesta pesquisa envolveram duas frentes: uma delas teve enfoque no cultivo das células de *Naegleria gruberi* e o estabelecimento de protocolos visando a transformação nas diferentes formas do organismo para investigar o comportamento de NgSPS2 nativa e a outra abordagem baseou-se nos experimentos bioquímicos e biofísicos para avaliar NgSPS2 recombinante em solução. Incluindo as motivações associadas à escolha de cada um dos experimentos será exposto, nessa seção, os fundamentos teóricos dos métodos e suas execuções.

3.1 Cultura de *Naegleria gruberi*

A prática de isolamento e cultivo de células animais tem sido principalmente utilizada como sistema modelo para estudos de ciclos biológicos⁶⁵, alvos metabólicos para o desenho de fármacos e estudos toxicológicos⁶⁶, sinalização celular⁶⁷, desenvolvimento embrionário⁶⁸, relações moleculares entre níveis de expressão gênica⁶⁹, variações epigenéticas e a duplicação celular⁷⁰.

Em busca de compreender o funcionamento da biossíntese de selenocisteínas nas três formas de *N. gruberi* foram realizados testes de diferenciação celular e de extração proteica total para análise de NgSPS2 nativa em condições metabólicas normais ou sob indução de estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio.

Também foram realizados ensaios imunoenzimáticos, *Western Blot*, para a detecção comparada de NgSPS2 após a produção de anticorpos específicos à porção C-terminal (NgSPS2.CTD) e à proteína inteira (NgSPS2.FL). A cultura de células foi enriquecida com selenito de sódio (3 a 500 μ M) para investigar os efeitos de selênio no perfil de crescimento da cultura.

3.1.1 Cultivos das Células - obtenção e manipulação

A cepa de *Naegleria gruberi* Schardinger (ATCC® 30224™) foi obtida durante o projeto de pós doutorado do Dr. Marco Túlio Alves da Silva.⁵⁶ As células foram mantidas sob crescimento a 26° C em garrafas de cultura de 25cm² contendo 10 mL de meio nutritivo.

Foram testados dois meios de cultivo: ATCC 1034 cuja formulação é recomendada ao crescimento de amebas de vida livre (tabela 1) e M7⁷¹, composto por 1,5 g/L L-metionina, 270 g/L dextrose, 7mM de tampão fosfato pH 6,5 (tabela 2).

Tabela 1 - Reagentes utilizados no preparo do meio de cultivo ATCC 1034 para manutenção *in vitro* dos trofozoítos de *N. gruberi*. O “*” para o tampão fosfato refere-se à descrição da tabela 2.

ATCC 1034 (1 L)	
Substrato	Quantidade
Peptona (BD#211677)	10 g
Extrato de levedura (Sigma#Y1625)	10 g
DNA de espermatozoide de salmão (Sigma#31149)	1 g
Ácido fólico (Sigma#F8798)	15 mg
Água destilada	880 mL
Esterilizados em autoclave (121°C por 15 minutos)	
Tampão fosfato (*)	20 ml
Hemina (Sigma#H9039)	1 mg/mL
Filtração por membrana de acetato de celulose (0,22 µM)	
Soro Fetal Bovino Inativo (GIBCO)	10 %
Penicilina-Streptomicina (Sigma#P4333)	10 ml
Ajustar para pH 6,5	

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Reagentes utilizados no preparo da solução estoque do tampão fosfato “*” adicionado aos meios de cultivo ATCC 1034 e M7.

Solução Tampão (1 L)	
KH ₂ PO ₄	18,1 g
NaH ₂ PO ₄	25 g
Água destilada	1 L
Acertar para pH 6,5	

Fonte: Elaborada pela autora.

A definição do meio de cultura mais adequado foi feita pela contagem de células em câmara de *Neubauer* durante nove dias de incubação. A figura abaixo demonstra a sequência envolvida na contagem celular.

Figura 19 - Representação do método de contagem das células. A - Uma série de oito agitações nas laterais da garrafa promoveu a individualização das células. B - Uma gota do meio de cultivo contendo as células em suspensão foi depositada em câmara de *Neubauer*. C - Os quatro quadrantes externos, Q = 1 mm² cada, foram contabilizados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao final da sequência descrita acima, o cálculo foi obtido em função do número de células dividido pelo volume de meio de cultura (ml) expresso na equação (1):

$$N = Fd \times Fc \times C \quad (1)$$

em que N é o número de células/ml e o valor C corresponde à média do número de células nos quatro quadrantes⁷³. F_c indica o fator de correção da câmara de *Neubauer* (10^4) e F_d o fator de diluição da gota utilizada para contagem.

O monitoramento do cultivo celular a partir da quantificação direta em câmara de *Neubauer* auxilia na determinação da curva de crescimento que, para *N. gruberi*, foi extraída a partir de um inóculo inicial (1×10^5 células) transferido a uma garrafa de cultivo contendo 10ml ATCC 1034. O número de células foi aferido diariamente, durante nove dias.

3.1.2 Obtenção dos extratos proteicos de *N. gruberi*

A obtenção do extrato proteico total foi baseada no teste de dois tampões de lise, Laemmli⁷⁴ e RIPA⁷⁵ (tabela 3).

Tabela 3 - Reagentes utilizados no preparo dos tampões de lise RIPA e Laemmli. A sigla EDTA significa ácido etilenodiaminotetracético e SDS corresponde a dodecil sulfato de sódio.

Estoque [2X]	
RIPA	Laemmli
40 mM Tris-HCl pH 7,5	125 mM Tris-HCl pH 6,8
300 mM NaCl	50% Glicerol
2% NP40	4% SDS
0,2% SDS	
Solução de uso [1X]	
[1X] RIPA	[1X] Laemmli
[1X] cOmplete, livre de EDTA (ROCHE)	5mM EDTA
	[1X] cOmplete, livre de EDTA (ROCHE)

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre os cinco testes descritos a seguir, três foram adaptações de FRITZ-Laylin L.K.⁷⁵ com o uso do tampão RIPA e dois deles foram planejados com o uso de Laemmli.⁷⁴ Ambos os tampões foram utilizados em estudos prévios que serviram de referência à seleção de cada passo metodológico empregado.⁷⁸⁻⁸⁰

A etapa inicial de todos os testes envolveu a quantificação das células, em câmara de *Neubauer*, para centrifugação da mesma quantia, 1×10^6 células total.

Método 1: As células foram centrifugadas (1500 g, 10 min, 26° C) e ao sedimento adicionou-se 10 ml PBS (137mM NaCl, 16mM Na₂HPO₄, 3 mM KH₂PO₄, 3mM KCl, pH 7,4). Novamente a amostra foi centrifugada conforme passo anterior e 1ml da solução de uso RIPA (tabela 2) foi adicionada ao produto decantado para homogeneizá-lo por vortexação. As células foram submetidas a choque térmico (30 minutos a -80° C e 15 minutos a 37° C) para a lise mecânica, seguido da homogeneização (vortexação) e centrifugação (10000 g, 15 min, 4° C) para a coleta e estocagem do sobrenadante.

Método 2: As células foram centrifugadas (1500 g, 10 minutos, 26° C) e ao sedimento adicionou-se 0,5 ml do tampão RIPA utilizado para homogeneizar o extrato celular que foi ressuscitado com uma seringa para aumentar a eficiência da lise. Novamente a amostra foi centrifugada (10000 g, 15 min, 4° C) e a fração solúvel estocada.

Método 3: As células foram lavadas duas vezes com 10ml de PBS e adicionou-se 1ml de tampão RIPA, a cultura permaneceu em repouso por 10 minutos à 25° C. Então as células

foram de aderidas da superfície (Figura 19-A) e centrifugadas por 15 minutos, 14000 g à 4° C para coleta da fração solúvel.

Método 4: As células foram transferidas à um tubo de 15 ml ao qual adicionou-se o coquetel inibidor de proteases [1x] cOmplete mini, livre de EDTA (Roche) e 5mM EDTA seguido pela agitação manual do tubo para homogeneização. A amostra foi então centrifugada (15 minutos, 1500 g à 4° C) o sedimento foi homogeneizado em 1ml de tampão Laemmli seguido de fervura (100° C) por 5 minutos e congelamento a -80° C.

Método 5: este procedimento assemelha-se ao método 1, diferindo apenas no tampão utilizado devido à homogeneização das células em 1m Laemmli [1X] ao invés de RIPA [1x].

Ao final de cada teste descrito acima, todos os extratos proteicos foram armazenados à -20°C e, para determinar o de maior rendimento, as amostras foram quantificadas por reação colorimétrica a partir da adição do corante Comassie Brillante Blue G-250 (Sigma-Aldrich).⁸¹ A quantificação por Bradford permite comparar as densidades ópticas fornecidas para a amostra de interesse em relação ao ajuste linear obtido pela curva de calibração proveniente da diluição seriada de uma proteína padrão. As absorbâncias foram aferidas e a construção da curva de calibração permitiu comparar a concentração do extrato proteico de *N.gruberi* a partir da equação da reta obtida na calibração do experimento.

A quantificação permitiu utilizar a mesma concentração de proteína, 40 µg total do extrato proteico obtido nos cinco métodos em análise, seguido pela aplicação em SDS-PAGE 10%, transferência eletroforética das proteínas à membrana de nitrocelulose (AmershamTM ProtranTM 0,45µm NC) e avaliação comparativa de cada extrato via coloração com 0,2% Ponceau (PS; Sigma). PS é um corante amplamente utilizado no monitoramento da transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose ou polivílidina (PVDF) e sua carga negativa permite a interação com os resíduos de carregados positivamente na cadeia polipeptídica, além de ser facilmente lavado e desligado das proteínas sem afetar a especificidade e eficiência do experimento.⁸²

Após selecionado o melhor, dentre os cinco métodos apresentados acima, foram obtidos extratos de proteína total na forma ameboide para uso na triagem da titulação dos anticorpos produzidos (*antiNgSPS2.FL* e *antiNgSPS2.CTD*), item 3.1.4 deste trabalho.

3.1.3 Diferenciação Celular

Amebas em fase exponencial de crescimento tiveram suas condições de cultivo alteradas para a obtenção de cistos e flagelados.

Para o encistamento foram preparadas duas garrafas de cultura com a mesma concentração inicial de amebas (7×10^5 células/ml) e os tratamentos envolveram:

Método 1: Adição de 0,1% (w/v) Sarcosil (*N-Lauroylsarcosine sodium salt*, Sigma-Aldrich) ao meio ATCC 1034. Após adição do detergente a cultura foi mantida a 26° C sem agitação. O experimento foi monitorado via aquisição fotográfica após 10, 40 e 80 minutos de seu início.

Método 2: Pela avaliação da curva de crescimento padrão de *N. gruberi* (item 3.1.1.) detectou-se um platô, próximo a nove dias de incubação, com predominância das formas císticas devido ao esgotamento dos nutrientes no meio de cultivo. Com isso, o método 2 envolveu a manutenção prolongada de uma cultura durante nove dias à 26° C sem agitação e sem reposição de nutrientes (ATCC 1034).

Quanto aos métodos de surgimento dos flagelos, foram feitos seis diferentes tratamentos como descrito a seguir:

Método 3) Este método avalia a influência da temperatura e ausência de nutrientes no meio de cultura. O meio de cultivo de duas garrafas de *N. gruberi*, cada uma com 3×10^6 células/ml, foi substituído por 10 ml de água destilada pH 6,9 e uma das culturas foi incubada por uma hora a 22° C retornando, em seguida, para 26° C. A segunda cultura, foi mantida à 37° C durante 24 horas e, na sequência, conduzida à 22° C para completar o surgimento dos flagelas, observada por 3 horas. Estes procedimentos foram adaptados de Jingle *et al.*⁸³

Método 4) Desequilíbrio iônico. Originalmente os íons foram associados à diminuição do multienflagelamento de *N. gruberi* por Burbidge e colaboradores (1984)⁸⁴, porém testes iniciais durante a presente pesquisa revelaram a indução na diferenciação. Uma cultura de 1×10^5 células/ml foi incubada por 36 horas à 25° C até atingir a fase *log* tardia e o meio de cultivo ATCC 1034 foi substituído por água destilada. As células foram centrifugadas (400 g, 7 minutos, 26° C) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em 1ml de água destilada e, após a homogeneização, quatro gotas deste material celular foram utilizadas como fonte para sub cultivos em 2ml de solução em placa de 12 poços (SPL Lifesciences) contendo meio de cultivo ATCC 1034 (Poços róseos da Figura 20) ou água destilada (Poços azuis da Figura 20), ambos na presença de 25mM dos sais NaCl, KCl, CaCl₂, LiCl ou MgCl₂.

Figura 20 - Placa de 12 poços com as respectivas soluções utilizadas para indução do surgimento dos flagelos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Após o inóculo, a placa foi mantida a 25° C sob agitação (100 rpm) durante duas horas e as análises foram feitas a cada 30 minutos via aquisição de imagens. Por avaliação prévia das condições exploratórias desenhadas na figura 20, a sequência deste método levou à ampliação da faixa de concentração para os sais NaCl, KCl e MgCl₂ permitindo estabelecer o 4.1. Este último envolveu as mesmas etapas iniciais que o método 4, porém a nova triagem incluiu soluções de 10-25 mM, em intervalos de 5 mM, para NaCl, KCl e MgCl₂. Para a execução do método 4.1 foram descartadas condições com uso de ATCC 1034 devido incidência maior de flagelares quando o meio de cultivo foi substituído por água destilada.

Método 5) Substituição do meio de cultivo ATCC 1034 pelo tampão 2 mM Tris pH 6,5. Inicialmente 7×10^5 células, em 10ml total, foram centrifugadas (1500 g, 1 min, 26° C) e lavadas com 2 mM Tris pH 6,5. Após homogeneização seguiu para separação (400 g, 7 min, 26° C). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 10 ml de 2 mM Tris pH 6,5 à 20°C seguido de nova centrifugação (10° C, 3000 rpm, 1 min). O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 10 ml de 2 mM Tris pH 6,5 à 25° C e mantidas em estufa por 5 horas sob agitação, 100 rpm, à 25° C. (Método adaptado de Fritz-Laylin *et. al* ⁷⁸).

Método 6) Substituição de ATCC 1034 por 2mM Tris suplementado com 10 mM KCl. Uma seleção inicial de duas culturas contendo 6×10^5 células foram centrifugadas a 1300 g por 1 minuto, 26° C e o sobrenadante foi descartado. Os precipitados de células foram ressuspensos em 5 ml de 2 mM Tris pH 7,5 com 10 mM KCl (método 6) ou 5 ml de 2 mM Tris pH 6,6 com 10 mM KCl (método 6.1.). Cada um dos homogeneizados foi transferido às

novas garrafas de cultura (25 cm²) e mantido sob agitação (100 rpm) à 22° C durante 2 horas. (Método adaptado Fulton, C. 1970.⁷)

Método 7) Inicialmente o meio ATCC 1034 de uma cultura a 2.10^5 células/ml foi retirado e adicionou-se 10 ml de 2 mM Tris pH 7,6 para ressuspensão das células aderidas ao fundo da garrafa. Os passos seguintes foram centrifugação (3 min, 400 g, 26° C), descarte do sobrenadante e lavagem do sedimento com 10 ml de 2 mM Tris pH 7,6. Novamente a amostra foi centrifugada (3 min, 400 g, 26° C), ao sedimento adicionou-se 10 ml de 2 mM Tris pH 7,6 à 25° C e a cultura foi conduzida à 37° C, sem agitação, por 4 horas.

Estes mesmos procedimentos foram realizados com outra garrafa de cultura na mesma concentração de células (2.10^5 células/ml), mas após a última lavagem com 2 mM Tris pH 7,6, seguida por centrifugação, o sedimento foi homogeneizado em 10 ml de 2 mM Tris pH 7,6 gelado. Após a última etapa de centrifugação, 10° C por 1,5 minuto a 500 g, 10 ml de 2 mM Tris pH 7,6 em temperatura de 25° C foi adicionado ao sedimento e então as células foram transferidas à nova garrafa de cultura e incubadas à 25° C com agitação (100rpm). Este método 7.1 é uma adaptação de Fulton, C., 1974.⁸⁰

A avaliação entre todos os métodos de enflaqueamento foi efetuada pela análise de imagens adquiridas digitalmente com uma câmera acoplada ao microscópio óptico invertido (Nikon-Eclipse TS100/F) e, para facilitar a compreensão das metodologias descritas acima e compará-las com a apresentação dos resultados, as informações de cada teste encontram-se na tabela 4.

Tabela 4 - Informações gerais para cada um dos experimentos de diferenciação celular. Os métodos 1 e 2 correspondem ao encistamento e 3 – 7.1 à exflagelação. Na última coluna, “Ref.” Corresponde à referência da qual o método foi adaptado.

Teste	Nº total de células	Composto adicionado ao meio de cultivo	Solução de cultivo	Temperatura / Tempo de incubação / Agitação	Ref.
1	7x10 ⁵	0,1% (w/v) Sarcosil	ATCC 1034	26°C / 80 min	7
2	7x10 ⁵	---	ATCC 1034	26°C / 9 dias	--
3	6x10 ⁵	---	H ₂ O destilada	22°C / 24 h 28°C / 3 h	83
3.1	6x10 ⁵	---	H ₂ O destilada	37°C / 24 h 22°C / 3 h	83
4	1x10 ⁵	25 mM NaCl, KCl, CaCl ₂ , LiCl, e MgCl ₂	H ₂ O destilada (2.H) ou ATCC 1034 (2.A)	25°C / 36 h 25°C / 2 h / 100 rpm	84
4.1	1x10 ⁵	10, 15, 20 e 25mM NaCl, KCl e MgCl ₂	ATCC 1034 (36 horas); H ₂ O destilada (2 horas)	25°C / 36 h 25°C / 2 h / 100 rpm	84
5	7x10 ⁵	---	2mM Tris, pH 6,5	25°C / 5 h / 100rpm	78
6	6x10 ⁵	10Mm KCl	2mM Tris, pH 7,5	22°C / 2 h / 100rpm	7
6.1	6x10 ⁵	10Mm KCl	2mM Tris pH 6,6	22°C / 2 h / 100rpm	7
7	7x10 ⁵	---	2mM Tris, pH 7,5	37°C / 4 h	80
7.1	7x10 ⁵	---	2mM Tris, pH 7,5	25°C / 4 h / 100rpm	80

Fonte: Elaborada pela autora.

Feita a escolha dos protocolos de diferenciação, foram preparadas culturas de *N. gruberi* em fase ameboide, cística e flagelar para extração proteica total e análise comparativa da presença de NgSPS2 através da detecção por *Western blot* (item 3.1.5).

3.1.4 Anticorpos *antiNgSPS2.FL* e *antiNgSPS2.CTD*

Nesta pesquisa os anticorpos policlonais foram produzidos pelo Laboratório de Imunologia no Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS – RS), a partir da imunização em coelhos. Inicialmente as proteínas recombinantes NgSPS2.FL e NgSPS2.CTD foram expressas, purificadas e 1,5mg total de cada amostra foi

submetida à SDS-PAGE 10% (etapas descritas nos tópicos 3.2.3, 3.2.5. e 3.2.6). As bandas de interesse foram recortadas do gel seguindo as especificações do fabricante e endereçadas ao laboratório responsável pela produção dos anticorpos.

3.1.5 Western Blot

Também conhecida como imuno-plotagem (*immuno blot*), esta técnica permite a caracterização de frações antigênicas imuno dominantes devido reatividade específica de anticorpos em uma mistura de proteínas. Por isso diversos experimentos empregados neste estudo envolveram, para vias de análise dos resultados, a aplicação do extrato proteico total de *N. gruberi* na presença dos anticorpos obtidos (item 3.1.4).

Deste modo, a eletroforese monodimensional foi feita utilizando o aparato *Mini-Protean Tetra Cell* (Bio Rad) e frações do extrato proteico total foram adicionadas ao tampão desnaturante (62,5mM Tri/HCl, pH 6,8 com 10% glicerol, 5% (v/v) β -mercaptoetanol, 2% SDS e 0,001% azul de bromofenol) na proporção 2:1 (extrato: tampão de amostra). Cada amostra foi fervida por 5 minutos, 40 μ g total foram aplicadas em SDS-PAGE 10% e o tampão externo da cuba foi composto por 125mM Tris, 960mM Glicina e 0,5% SDS pH 8,3. A eletroforese iniciou-se com 80 volts, 350 mA por 30 minutos para alinhar as amostras no início do gel de resolução e, na sequência, prosseguiu por 100 minutos a 150 volts. O marcador de massa molecular utilizado em todas as eletroforeses foi *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Life Technologies).

O sistema *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (BIO-Rad) foi utilizado para fixar as proteínas em membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) utilizando tampão de transferência (25 mM Tris, 192 mM Glicina e 20% metanol) durante 1 hora, 100 volts e 350 mA. Para avaliar a eficiência da transferência, a membrana foi corada com 0,2% *Ponceau* seguido por lavagens em água para retirar o corante. A prevenção de ligações não específicas no sistema de detecção ocorreu via bloqueio da membrana, por uma hora a 25° C, com 5% de leite em pó desnatado (Molico) dissolvido em PBS na presença de 0,1 % Tween-20 (PBST).

Na sequência a membrana foi incubada com um dos anticorpos primários (*anti*-SPS2.FL, *anti*-SPS2.D ou *anti* actina) diluídos em PBST de acordo com a titulação desejada e o objetivo de cada *Western Blot* (Tabela 5). A membrana foi incubada a 16 horas, 4° C com agitação em homogeneizador (Agitador Multifuncional VDRL-Kline) e na sequência foram feitas três lavagens em PBST (10 min cada). A membrana foi incubada com anticorpo

secundário *anti*-IgG de coelho (Sigma), na diluição 1:5000, sob agitação branda durante 80 minutos à 23° C. Novas lavagens com PBST foram realizadas e as membranas foram reveladas pelo método quimioluminescente.³⁹ Foi preparada uma solução reveladora (1,1% luminol, 0,48% ácido P-cumárico e 11,1% Tris 1 M pH 8,5) e a reação para emissão da quimioluminescência iniciou-se com adição do agente oxidante peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na proporção 1:300 (v/v).

As membranas foram reveladas com o *scanner C-Digit Blot* (LI-COR Biosciences UK Ltd) e as imagens foram adquiridas pelo *software Image Studio*TM (LI-COR Biosciences UK Ltd).

Tabela 5 - Resumo de todos os experimentos de *Western Blot* realizados ao longo da pesquisa. Coluna 1 - numeração de cada experimento, coluna 2 – nome do anticorpo primário (1° Ac), titulação e tampão em que foi dissolvido, coluna 3 – objetivo do experimento e o tipo de amostra escolhida para análise do extrato proteico total, coluna 4 - item deste trabalho em que estão descritos os detalhes de cada experimento. Na segunda coluna, a sigla P.I. refere-se ao soro pré imune.

	1° Ac/Título/Tampão	Objetivo / Amostras	Item
1	<i>antiNgSPS2FL</i> + P.I. / <u>1:650</u> – <u>1:1150</u> (intervalos 100-100) / PBST	Triagem da titulação / ameboides	3.1.2 e 3.1.4
2	<i>antiNgSPS2.CTD</i> / 1:4000; 1:5000; <u>1:5500</u> – <u>1:6000</u> (intervalos 1000-1000) / PBST	Triagem da titulação / ameboides	3.1.2 e 3.1.4
3	<i>antiNgSPS2FL</i> / 1:600; 1:900; 1:1000 / PBST	Comparativo morfológico / Cistos, flagelares e ameboides	3.1.3
4	<i>antiNgSPS2.CTD</i> / 1:4000; / PBST	Comparativo morfológico / células enflageladas e cistos	3.1.3
5	<i>antiNgSPS2FL</i> + P.I. / 1:1000 / PBST	Comparativo morfológico / Cistos, flagelares e ameboides	3.1.3
5.1	<i>antiNgSPS2FL</i> + P.I. / 1:1500 / PBST	Comparativo morfológico / Cistos, flagelares e ameboides	3.1.3
6.1	<i>antiNgSPS2FL</i> / 1:1000 / PBST	Avaliação indução de estresse com H ₂ O ₂ / ameboides na presença e na ausência de Se	3.1.7
6.2	<i>anti-actina</i> / 1:50 / PBST	Controle negativo avaliação indução de estresse com H ₂ O ₂ / ameboides na presença e na ausência de Se	3.1.7

Fonte: Elaborada pela autora.

O primeiro *Western Blot* (coluna 1, linha 2) serve de exemplo para orientar a interpretação das informações resumidas na coluna 2 (1º Ac/Título/Tampão) da tabela 5 que contém, em ordem: o anticorpo primário escolhido (*antiNgSPS2.FL* e pré imune *antiNgSPS2FL*), a faixa de diluição correspondente incluindo o intervalo entre cada título (1:650; 1:750; 1:850; 1:950; 1:1050; 1; 1:1150) e o tampão utilizado (PBST + 2,5% Leite em pó). Para trabalhar com mais de uma concentração de anticorpo a metodologia envolveu o recorte da membrana de nitrocelulose em faixas (Figura 21-1) que foram incubadas separadamente (Figura 21-2).

Figura 21 - Modelo de recorte da membrana de nitrocelulose para incubação isolada com diferentes concentrações de anticorpo em um mesmo *Western Blot*. Inicialmente a membrana de nitrocelulose foi recortada em faixas (1) que foram imersas separadamente numa placa especial (2) para incubação com diferentes títulos do anticorpo (3) incluindo comparativo entre os soros imune (I) e pré imune (P.I.).

Fonte: Elaborada pela autora.

A concentração dos extratos proteicos de *N. gruberi* foi determinada com o uso do Kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific).

3.1.6 Suplementação com selenito de sódio

Estudos de suplementação de selênio relacionados à via de biossíntese de Sec geralmente investigam o aumento da expressão das selenoproteínas em resposta à presença do elemento traço na dieta ou meio de cultivo celular³. Neste sentido buscamos correlacionar o papel de selenofosfato sintetase de *Naegleria gruberi* (*NgSPS2.FL*) em resposta ao aumento

de selênio no interior das células verificando as mudanças no crescimento celular e o nível de citotoxicidade de selênio.

O primeiro teste exploratório realizado envolveu uma cultura de *N. gruberi* que foi subcultivada, em placa de 12 poços, na presença de diferentes concentrações de selenito de sódio (figura 22).

Figura 22 - Representação do primeiro teste de suplementação de selênio. A figura mostra uma placa de 12 poços com suas respectivas concentrações (em μM) de selenito de sódio, incluindo uma cultura controle (A1) na ausência do composto.

Fonte: Elaborada pela autora.

Em cada uma das condições dispostas na figura 22 foram adicionados, inicialmente, 2 ml do meio de cultivo ATCC 1034 fresco, solução de selenito de sódio nas devidas concentrações e uma cultura de células foi subcultivada em concentração final de $6,2 \times 10^4$ células/ml. Considerando que o teste foi elaborado apenas para verificar se as concentrações escolhidas para a suplementação forneceriam resposta celular, a avaliação foi feita visualmente com auxílio de microscópio óptico após 48 e 72 horas de cultivo.

Assim sendo, a nova suplementação envolveu o subcultivo de uma cultura a concentração final de $1,5 \times 10^2$ células/ml em garrafas de cultura contendo 10 ml de meio ATCC 1034 sob oito concentrações de selenito de sódio, conforme representado na Figura 23.

Figura 23 - Etapas envolvidas na suplementação das células de *N. gruberi*. A numeração 1, 2 e 3 orienta a sequência de eventos aplicados neste experimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para avaliar as alterações na replicação das células e a possível diferenciação na forma de ameboide para flagelar ou cística, a contagem periódica das culturas foi determinada conforme representado na etapa 2 da Figura 23. O experimento foi feito em triplicata, para cada uma das concentrações de selenito de sódio, com o objetivo de minimizar a margem de erro associada tanto ao preparo do experimento quanto à contagem das células. Por fim os dados coletados foram interpretados pela representação gráfica do número de células em função do tempo de incubação (etapa 3, Figura 23).

Em complemento a abordagem quantitativa, após 140 horas de incubação, cada um dos tratamentos foi fotografado em microscópio óptico com a finalidade de obter informação fenotípica referente às formas de *N. gruberi*.

3.1.7 Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Pesquisas desenvolvidas em nosso grupo de pesquisa revelaram uma correlação positiva entre o estresse oxidativo e a expressão de selenofosfato sintetase em Tripanossomatídeos.⁸⁵ A fim de investigar como esta relação se estabelece para *N. gruberi* foi feita indução de estresse em uma cultura de células ameboides adicionando-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

O ensaio envolveu o preparo de uma cultura de *N. gruberi* na presença de diferentes concentrações de H_2O_2 variando de 290 μM a 1,16 mM. A escolha destes valores foi feita a partir de dois ensaios pilotos partindo de concentrações mínimas de H_2O_2 até concentrações mais elevadas para estabelecer a faixa de resposta celular, baseada no aumento ou diminuição do número de células. Estes ensaios foram detalhados na tabela 6.

Tabela 6 - Indução de estresse celular. Série de testes realizados para definir a melhor concentração de H_2O_2 . Os dois primeiros ensaios serviram de orientação para definir a faixa de H_2O_2 selecionada no terceiro experimento.

	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio
Cultura inicial (células/ml)	3,5x10 ⁵	4,3x10 ⁵	6,4x10 ⁵
Diluição de repique (v/v)	1:100	2:100	2,2:100
Concentrações de H₂O₂	0; 0,29; 2,9; 5,8; 11,6 e 23,2 (μM)	0; 29; 58; 87; 116; 145; 174; 232; 290 (μM) e 1,45; 2,9 (mM)	0; 0,29; 0,36; 0,43; 0,5; 0,58; 0,65; 0,72; 0,87, 1,16 (mM)
Grupo	Único	Único	Grupo 1 (sem Se); Grupo 2 (com 10 μM Se)
Tempo de contagem (horas após o sub cultivo)	120	64	12, 24, 36, 48
Faixa de resposta	---	Entre 1 e 5 mM	Todas

Fonte: Elaborada pela autora.

Definida a faixa de H_2O_2 a ser investigada no terceiro ensaio surgiu um segundo grupo de análise (linha 5, coluna 4 da tabela 6) devido ao interesse em comparar a resposta das células estressadas na presença de selenito de sódio, fonte de selênio para a potencialização da via de selenoproteínas. Pela avaliação dos resultados obtidos a partir da suplementação com selênio (item 3.1.6), a concentração de 10 μM foi utilizada no preparo do grupo 2 (3º ensaio da tabela 6) e todas as contagens foram analisadas comparativamente, entre os grupos 1 e 2, para cada uma das concentrações de peróxido de hidrogênio.

Estabelecidos os parâmetros utilizados no preparo do 3º ensaio foram conduzidas duas análises:

1) A aplicação do teste estatístico conhecido como teste T (*Student's T-test*), muito utilizado para o comparativo entre médias, foi empregado a fim de explorar o quão significativa apresentou-se a resposta celular frente às diferentes concentrações de H_2O_2

utilizadas relacionando o grupo em que não foi adicionado selenito de sódio (grupo A) e o grupo que recebeu suplementação adicional (grupo B).

O teste T é um teste paramétrico adequado ao tratamento de dados que obedecem à distribuição normal e permitem calcular média e desvio padrão. A partir de cada média obtida durante a contagem das células foram extraídos a variância e o desvio padrão, que permitiram calcular a estatística do teste T utilizando-se o teste unilateral em que a hipótese nula (média do grupo A é igual à média do grupo B) fosse superada pela hipótese positiva (média do grupo B é significativamente superior que grupo A). Considerar o grau de significância de $p < 0,05$ significa que foram considerados significativos, marcados com asterístico (*) nos gráficos, apenas os valores acima de 95% de chances de refutar a hipótese nula.

2) No último ponto de contagem do terceiro ensaio (48 horas, linha 6 da tabela 6) foi feita extração proteica total de cada uma das concentrações de H_2O_2 para comparativo dos níveis de expressão de NgSPS2FL entre as médias estatisticamente relevantes. Para análise quantitativa do *Western Blot* realizado nesta etapa, a comparação nos níveis de expressão de NgSPS2 foi feita incluindo uma proteína que não sofre alteração na expressão. Ou seja, o controle negativo do experimento baseou-se na análise comparada entre uma condição invariável (expressão da proteína controle) e a condição variável (expressão de NgSPS2).

O *Western Blot* feito para a análise do extrato proteico total, após a indução de estresse, seguiu a mesma sequência padrão de incubação com anticorpo *antiNgSPS2.FL*, lavagens, bloqueio e revelação da membrana de nitrocelulose conforme descrito no item 3.1.5. As amostras escolhidas foram provenientes do estresse com 500 μM H_2O_2 não suplementada com o selenito de sódio (amostra 1) e suplementada com 10 μM selenito de sódio (amostra 2).

3.2 Análise da proteína selenofosfato sintetase de *N. gruberi*

Inicialmente os parâmetros físico-químicos teóricos da proteína NgSPS2 foram analisados por ferramentas bioinformáticas através de sua sequência primária. Construções gênicas para a proteína inteira NgSPS2.FL e para o domínio C-terminal (NgSPS2.CTD) foram cedidas pelo Dr. Marco Túlio Alves da Silva e utilizadas durante a expressão heteróloga das proteínas. NgSPS2.FL foi utilizada, nesta pesquisa, apenas para a produção de anticorpo policlonal enquanto NgSPS2.CTD, além deste objetivo, foi investigada por métodos cromatográficos e experimentos biofísicos para compreensão de suas características

bioquímicas e biofísicas a fim de correlacionar seu comportamento em solução com a função biológica exercida.

3.2.1 - Análise *in silico* e obtenção dos plasmídeos

O uso de programas de bioinformática para a predição *in silico* de diversas propriedades estruturais e funcionais de proteínas é uma ferramenta útil para a compreensão dessas macromoléculas. Neste trabalho, a análise teórica inicial dos parâmetros físico-químicos da enzima NgSPS2 foi feita através da sequência primária com o uso da ferramenta ProtParam do servidor ExPASy⁸⁶ e uma análise de domínios foi conduzida pelo servidor SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*).⁸⁷

A sequência de aminoácidos de NgSPS2 foi investigada pelo servidor UniProt (*Universal Protein Research*)⁸⁸ que atribui uma série de informações sobre sua sequência reunindo o que tem sido estudado a respeito do gene e inclui dados como a localização celular da proteína, patologias associadas e resíduos com papel biológico funcional.

A fim de avaliar identidade sequencial de selenofosfato sintetase de *N. gruberi* com proteínas homólogas foi utilizado o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) e a base de dados de domínios conservados (CDD).⁸⁹

A partir disso foram selecionadas seis proteínas (SelD de *Escherichia coli*, SPS2 e SPS1 humana, SelD de *Aquifex aeolicus*, SelD de *Leishmania major* e SelD de *Trypanosoma brucei* e SelD de *Methanococcus jannaschii*) cujas sequências primárias foram submetidas ao alinhamento múltiplo com a sequência de NgSPS2 através do programa ClustalW⁹⁰ a fim de identificar a conservação de aminoácidos importantes para a manutenção da estrutura e função da enzima.

Para a obtenção dos plasmídeos, inicialmente foi feito o desenho dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene que codifica para a proteína inteira (NgSPS2.FL) e da sequência gênica que codifica para o domínio C-terminal (NgSPS2.CTD). A amplificação foi realizada com o cDNA de *N. gruberi* como molde para as reações em cadeia da polimerase (PCR), considerando que o cDNA foi obtido por transcrição reversa (RT) a partir do RNA total da ameba. As sequências gênicas foram então clonadas em vetor de expressão sistema pET e transformadas em cepa de expressão *E. coli* BL21 (λ -DE3). Os plasmídeos pET32a-ngsps2FL e pET32a-NgSPS2.CTD foram confirmados por sequenciamento e as células transformadas foram cedidas à presente pesquisa. Todas as etapas desde o desenho dos oligos à transformação das células competentes foram realizadas

pelo Dr. Marco Túlio Alves da Silva em pesquisa⁵⁶ anterior desenvolvida em nosso grupo de pesquisa.

3.2.2 - Expressão das proteínas

Desconhecidas as melhores condições para alto rendimento e solubilidade de NgSPS2.FL, foram realizados inicialmente testes de expressão cuja variação envolveu o tempo de indução e a temperatura. Quanto à produção de NgSPS2.CTD as condições primárias de expressão foram estabelecidas durante o pós doutorado do Dr. Marco Tulio Alves da Silva, como descrito no item 3.2.5.

3.2.2.1 Testes de expressão - NgSPS2.FL

Pré inóculos de ngsp.s.fl/pET32a(+) em *E. coli* BL21 (λ -DE3) foram crescidos em 5mL de meio de cultivo Luria Bertani LB⁹¹ na presença de ampicilina (50 μ g/ml) e foram mantidos sob agitação, 250 rpm, durante 16 horas à 37° C.

Aliquotas de 100 μ L das culturas resultantes foram inoculadas em novos tubos de ensaio com 10 ml de LB (razão 1:100) e ampicilina (50 μ g/ml). As células permaneceram sob agitação à 37° C até alcançarem a D.O._{600nm} (densidade óptica a 600nm) de 0,6 correspondente ao fim do crescimento exponencial da cultura. Nesta etapa foi adicionado 0,5mM IPTG, concentração pré estabelecida em análises iniciais feitas pelo Dr. Marco Túlio Alves da Silva, e na sequência um grupo teste foi conduzido a 20°C e o outro permaneceu a 37° C, ambos sob agitação de 180 rpm.

O monitoramento da expressão foi feito a partir da retirada de 100 μ l amostras a cada 2 horas de indução em um tempo total de 12 horas seguido pela verificação por eletroforese em géis poliacrilamida 10%. A partir dos resultados obtidos com este teste seguiu-se com a expressão em maior escala (1L) cujas condições selecionadas envolveram indução da expressão proteica com 0,5 mM IPTG, durante 8 horas, sob agitação à 20° C.

Na sequência, a cultura foi centrifugada a 4500 rpm, 4° C durante 40 minutos para separar o material particulado da solução em suspensão. A fração solúvel foi descartada e ao sedimento foram adicionados 50 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300mM NaCl, 1 μ g/mL leupeptina, 1 μ g/mL pepstatina A; 0,5 μ g/ml aprotinina, 1mM PMSF (fluoreto de fenilmetilenosulfonila), 1% glicerol, 10 mM Imidazol, 1mg/mL lisozima e 5mM DTT).

Após homogeneizado no tampão de lise, o extrato de células foi ultrassonicado em *Branson Sonic Power Co.* O extrato bruto foi mantido em gelo durante o processo seis ciclos de 30 s cada intercalados por repouso durante 1 minuto. O lisado celular foi então clarificado por 30 min a 13000 rpm e 4° C para obtenção da fração solúvel e do precipitado.

Em todas as etapas acima, amostras foram retiradas para monitoramento das condições de expressão e foram submetidas a SDS-PAGE 10%, cujo resultado revelou a proteína de interesse na fração insolúvel. Com isso a solubilização da amostra foi testada por dois métodos: inicialmente foi utilizada solubilização alcalina adicionando-se NaOH ao sedimento homogeneizado em tampão e, na sequência testes de solubilidade foram feitos a partir da variação na constituição do tampão de lise, incluindo a adição de detergentes.

3.2.3 Solubilização alcalina

O teste de solubilização alcalina partiu da expressão de *NgSPS2.FL* em 1L de meio de cultura LB conforme condições estabelecidas no item 3.2.2.1 e, após centrifugação das células, o sedimento foi homogeneizado em tampão de lise (300 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de imidazol, 1 pastilha do inibidor de proteases cOmplete, livre de EDTA, 5mM DTT e 2% glicerol).

Na sequência o homogenato celular foi ultrassonicado (5 ciclos de 30seg cada) e clarificado por centrifugação a 13000rpm, 30min, 4°C. A fração insolúvel contendo *NgSPS2.FL* passou por um ciclo de três lavagens com 50 ml do tampão de lise, intercaladas por etapas de centrifugação (30min, 4°C, 13000rpm) entre cada lavagem. Após a terceira lavagem a fração insolúvel foi novamente homogeneizada em 50ml de tampão de lise e conduzida a 4°C para adição, fracionada, de gotas de NaOH 4M permanecendo sob agitação constante.

Ao atingir pH 12,00 a amostra foi dialisada contra um tampão contendo 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM imidazol e 2% glicerol a fim de reestabelecer o pH 8,0. Na sequência a amostra foi novamente clarificada (30 minutos, 4°C, 13000rpm). A fração insolúvel (F_i) foi descartada e a fração solúvel (F_s) foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade.

Amostras das frações solúvel e insolúvel foram retiradas, a cada etapa da solubilização alcalina, para análise em SDS-PAGE 10%.

3.2.4 Teste de Solubilidade

O segundo método de solubilização avaliado baseou-se na variação do tampão de lise a partir da adição de detergentes. Para tanto *NgSPS2.FL* recombinante foi expressa em 1 L de meio cultura a partir do protocolo de expressão descrito no final do item 3.2.2.1. O sedimento de células foi ressuspensionado em 50ml de Tampão de Lise A (300 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de imidazol, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina; 1,0 µg/ml aprotinina, 1mM PMSF, 5mM β-mercaptoetanol, 1mg/mL lisozima) e foi dividido em seis amostras isoladas para a adição de 10% glicerol, 1% Tween-20, 20mM CHAPS, 1% N-Lauril Sarcosine, 10% Nycodenz, 1,5mM MgCl₂ e 1% Triton X-100.

Cada um dos compostos adicionais foi misturado no tubo junto à amostra do sedimento bacteriano ressuspensionado em tampão de lise A e, após homogeneização, foram incubados a -20° C por 2 horas. Cada amostra foi agitada, centrifugada (4°C por 30 min a 13000 rpm) e as amostras das frações solúvel e insolúvel foram avaliadas em SDS-PAGE 10%.

3.2.5 Expressão e lise de *NgSPS2.CTD*

Previamente estabelecidas as condições de expressão iniciou-se a produção de *NgSPS2.CTD*-pET32a(+)-*E. coli* BL21 (λ-DE3) em larga escala preparando-se um pré inóculo de 5ml LB com adição de 50µg/ml ampicilina, mantido sob agitação a 180 rpm, 37° C por 16 horas. Na sequência o volume total do crescimento das células foi inoculado em 1L de meio de cultura líquido permanecendo a 37° C sob agitação de 180 rpm até atingir a D.O._{600nm} 0,6. Nesta etapa foi adicionado 0,5mM IPTG e a cultura foi transferida à 20° C, agitação 180 rpm, durante 6 horas.

As células foram centrifugadas (40 min, 4500 rpm, 4° C), a fração solúvel foi descartada e ao sedimento foram adicionados 50 mL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl, 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml pepstatina; 0,5 µg/ml aprotinina, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1% glicerol e 10 mM Imidazol). Na sequência o homogenato celular foi ultrassonicado (6 ciclos de 30 s cada) e centrifugado a 13000 rpm por 30 min a 4° C.

A fração solúvel foi pré clarificada e conduzida a purificação. O monitoramento da expressão e lise da proteína recombinante foi feito pela coleta de alíquotas que foram aplicadas em eletroforese em gel poliacrilamida 15%. O gel foi corado com 0,01% *Comassie brilliant blue* e descorado em ácido acético 10%.

3.2.6 Purificação por cromatografia de afinidade

Devido a clonagem dos genes para *NgSPS2.FL* e *NgSPS2.CTD* em vetor pET as proteínas foram expressas em fusão com seis histidinas (*His-Tag*) na região N-terminal para a purificação em afinidade utilizando resina Sepharose CL-6B Ni-NTA (Níquel - Ácido Nitrilo Triacético) QIAGEN como indicado na figura 24-1.

Figura 24 - Representação das ligações envolvidas na cromatografia de afinidade. 1 - constituintes da matriz (NTA e Sepharose CL-6B) interagindo com os resíduos de histidina da fase móvel. 2 – representação química do composto imidazol e do aminoácido histidina.

Fonte: Adaptada de QIAEXPRESSIONIST⁹³

Inicialmente a resina foi lavada com 10 volumes de coluna (VC) com água ultrapura (tipo Mili-Q) e em seguida equilibrada com cinco VC do tampão A (300mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,0 e 10mM Imidazol) a um fluxo de 2ml/min e pressão 0,5 MPa.

O produto da lise celular para *NgSPS.FL* e *NgSPS.CTD* obtidas conforme descrito nas seções 3.2.3 e 3.2.5 foi clarificado em filtro 0,45 µm (Chromafil® PET-45/15 MS) e foram conduzidas purificações isoladas para cada um dos extratos. Desse modo 50 ml de cada fração proteica pré clarificada foi aplicada à resina seguida por sucessivas lavagens com tampão A para retirada de proteínas com interação inespecífica à resina.

A eluição das duas proteínas de interesse foi feita com gradiente linear de imidazol de 0% a 100% de tampão B (tampão A + 500mM Imidazol) durante 30 minutos. Para a cromatografia de *NgSPS2.CTD* foi necessária a adição de 1% glicerol nos tampões A e B e

2% glicerol para NgSPS.FL a fim de estabilizar a estrutura nativa das proteínas ao longo da purificação.

Alíquotas foram retiradas a cada etapa para verificação em 10% (para NgSPS2.FL) e 15% (para NgSPS.D) SDS-PAGE. As frações de NgSPS2.FL e NgSPS2.CTD eluídas durante a purificação foram transferidas a membrana de diálise (*Spectra/Por® 3 Dialysis Membrane*) e ficaram imersas em tampão 300mM NaCl, 50mM Tris pH 8,0 e mantidas à 4° C. Foram feitas três trocas com tampão fresco com 5mM DTT. Ao final da diálise as amostras foram concentradas por ultrafiltração em membrana Millipore, sob rotação a 2000 g, 4° C e então quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Após concentrada uma alíquota pura de NgSPS2.CTD a 15,2 mg/ml foi empregada em ensaios de rastreamento de condições de cristalização.

Uma amostra de NgSPS2.FL pura, dialisada e concentrada foi aplicada em SDS-PAGE 10% e, após recortar a banda da proteína, esta foi utilizada como antígeno para a produção de anticorpo policlonal (item 3.1.4). Para a proteína NgSPS2.CTD, após a purificação, uma amostra foi conduzida a cromatografia de exclusão molecular a fim de determinar estado de oligomerização e a fração resultante seguiu à clivagem com trombina para a continuidade dos estudos biofísicos e bioquímicos.

3.2.7 Clivagem de NgSPS2.CTD com trombina

Para a retirada da extensão de histidinas foi efetuada a clivagem da região N-terminal de NgSPS2.CTD com a protease sítio específica trombina (Amershan Biosciences). A reação envolveu adição de 1 unidade (1 U) da protease para cada 100 µg de proteína recombinante. A amostra proteica após cromatografia de afinidade, diálise e concentração à 18,4mg/mL foi incubada com 1U/100 µg trombina por 12 horas a 20° C e a reação foi interrompida com 1mM PMSF.

3.2.8 - Cromatografia de exclusão molecular - SEC

O uso da cromatografia de exclusão molecular teve dois principais objetivos sendo: a separação entre a proteína de interesse e outras moléculas contaminantes, de dimensões diferentes, e uma avaliação analítica para caracterizar o estado de oligomerização de NgSPS2.CTD.

A coluna Superdex 200 HR 10/300 (GE) acoplada ao sistema de cromatografia AKTA Purifier (GE) foi previamente equilibrada no mesmo tampão usado para diálise e 500µl da amostra resultante da clivagem com trombina, concentrada por ultrafiltração em membrana Millipore, a 22mg/mL foi aplicada na resina e o fluxo da corrida seguiu 0,5 ml/min com monitoramento da purificação a 280nm. O resultado da purificação foi avaliado em SPS-PAGE 15%.

3.2.9 Proteólise limitada

A obtenção de NgSPS2.CTD sem a região de possível instabilidade estrutural correspondente a sequência N-terminal flexível foi realizada por ensaio de proteólise limitada após as etapas de clivagem com trombina e purificação por exclusão molecular. Baseados em estudos anteriores⁹⁵⁻⁹⁷ que reportaram o uso de enzimas proteolíticas para obtenção de domínios estáveis que favoreçam a cristalização, foram feitas cinco diferentes reações com as enzimas descritas na tabela 7.

As enzimas proteolíticas descritas na tabela 7 clivam a macromolécula em sequências específicas e o objetivo foi determinar a melhor condição de proteólise que resultasse em um peptídeo estável para NgSPS2.CTD. O resultado foi analisado em SDS-PAGE 15% em comparação com a análise *in silico* pelo programa PeptideCutter, ExpaSy⁹⁸, que forneceu todos os possíveis sítios de clivagem na sequência de NgSPS2.CTD para cada uma das enzimas proteolíticas. A massa molecular teórica de cada produto clivado foi obtida pela ferramenta ProtParam, ExpaSy.

Tabela 7 - Enzimas proteolíticas utilizadas no teste de proteólise limitada. Na tabela constam a solução tampão em que as enzimas foram diluídas, os sítios específicos de clivagem na cadeia peptídica e sua classificação dentre as famílias de proteases. O tampão A descrito na coluna 2 foi composto por 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0.

Enzimas	Solução estoque	Sítios de Clivagem	Classificação
Pepsina (Merk Millipore 1071901000)	1mg/mL tampão A	Hidrolisa N-terminal de Trp (Leu; Phe; Tyr)	Protease ácida
α-Quimotripsina (C7762 Sigma)	1 mg/mL tampão A + 1 mM HCl + 2 mM CaCl ₂	Hidrolisa C-terminal de Phe; Trp; Tyr	Serino protease endopeptidase
Tripsina (T1426 Sigma)	1 mg/mL tampão A + 1 mM HCl + 2 mM CaCl ₂	Hidrolisa C-terminal de Phe; Arg (Lys)	Serino protease
Elastase (E0258 Sigma)	1 mg/mL tampão 200 mM Tris/HCl pH 8,8	Hidrolisa C-terminal de Ala, Val, Leu, Ile, Gly, Ser	Serino protease endopeptidase
Subtilisina A (P5380 Sigma)	1 mg/mL tampão A + 10mM Ca(OAc) ₂ + Na(OAc) ₂	Clivagem de resíduos neutros e ácidos	Serino protease endopeptidase

Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente foram preparados os estoques de cada enzima e uma alíquota de NgSPS2.CTD após clivagem com trombina seguida de purificação por cromatografia de exclusão molecular, sendo concentrada a 5mg/mL foi utilizada nas reações de proteólise. As enzimas foram testadas em três diferentes concentrações (100 µg/ml; 250 µg/ml e 500 µg/ml), diluídas em tampão A e as reações foram mantidas à 20° C. O tempo de incubação foi testado com a retirada de frações em intervalos de 5 minutos ao longo de 35 minutos para a correta avaliação da clivagem. As reações foram interrompidas com 1mM PSMF e as alíquotas foram submetidas a SDS-PAGE 15%.

3.2.10 Caracterização bioquímica e biofísica de NgSPS2.CTD

3.2.10.1 SEC - avaliação analítica

Para investigação analítica da massa molecular de NgSPS2.CTD foi necessário, inicialmente, calibrar a coluna Superdex 200 10/300 (GE) com a purificação de amostras de

massa molecular conhecida permitindo a construção de curvas de calibração que relacionam o volume de eluição e a respectiva massa.

Com uso do Kit comercial de calibração da coluna (*Gel Filtration Markers Kit* – Sigma Aldrich), cinco proteínas foram purificadas segundo as recomendações do fabricante para sequência de purificação e concentração de amostra a ser aplicada. O tampão A foi utilizado na fase móvel para a diluição das proteínas do Kit.

O azul de dextran, presente nos Kits de calibração, foi utilizado como substância de referência para a calibração da coluna de gel filtração por ser eluído no void, também conhecido como volume morto da resina ($V_o = V_e$ para azul dextran) representando o volume da parte externa dos poros da matriz suporte.⁹⁴

As relações que determinam a calibração da curva padrão envolvem o cálculo do volume total (V_t) de amostra capaz de ocupar livremente tanto a região externa da matriz (volume do void, V_o) como a região interna entre os poros da fase imóvel (volume interno, V_i) conforme equação a seguir:

$$V_t = V_i + V_o \quad (2)$$

O volume de eluição (V_e) é uma medida nos extremos entre o volume total e o volume morto, dependente do quanto a molécula consegue se difundir nos poros da coluna. Esta distribuição ao longo da resina é definida pelo coeficiente de distribuição (K_{av}) cuja relação com o volume de eluição é dada por:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o) \quad (3)$$

A partir destas relações o valor de K_{av} foi utilizado na equação da reta. Todas as etapas envolvidas na calibração da Superdex 200 10/300 (GE), desde a purificação das proteínas à análise dos pontos de eluição e construção da curva, foram realizadas pelo aluno de doutorado Ivan Rosa e Silva e os resultados plotados utilizando o *software* Origin 8.6 (*OriginLab*) foram cedidos à presente pesquisa a fim de comparar o volume de eluição obtido durante a purificação de NgSPS2.CTD.

3.2.10.2 Eletroforese em Gel Nativo

Esta técnica avalia as proteínas em seu estado nativo, na ausência de agentes desnaturantes, e permite obter informações quanto ao estado oligomérico das macromoléculas.

Uma amostra de NgSPS2.CTD após clivagem com trombina e purificação por cromatografia de exclusão molecular foi concentrada a 2,3 mg/mL e, após diálise em tampão

sem sal (20 mM Tris pH 8,0), 4 µl da amostra foi aplicada no gel não desnaturante com gradiente de 8-25 % de poliacrilamida (*PhastGel-GE*).

Após etapas de coloração (*Comassie Blue* G-50 0,1% em solução aquosa de metanol 25% e ácido acético 5%) e descoloração (30% metanol, 10% ácido acético em água destilada), obteve-se o padrão da distância percorrida por NgSPS2.CTD clivada com trombina comparado ao padrão de massa molecular composto por: tiroglobulina bovina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalase (232 kDa), aldolase (140 kDa) e albumina bovina (66 kDa).

3.2.10.3 Espectroscopia de dicroísmo circular - CD

Utilizado para avaliar o modo como moléculas assimétricas interagem com a luz plano polarizada, o dicroísmo circular (CD) está associado à absorção diferencial da luz circularmente polarizada para esquerda ou para direita, cujo desvio é dado pelo grau de elipsidade (θ). Regiões assimétricas na cadeia covalente das proteínas permitem sua análise estrutural por CD cujas principais aplicações trazem informações conformacionais e termodinâmicas do enovelamento, além de permitir análises de interação com complexos.⁹⁹

As medidas obtidas pela absorção diferencial da luz se baseiam no princípio de Beer Lambert¹⁰⁰ cuja adaptação para CD reflete a medida na variação da absorção (ΔA) entre a absorção do feixe polarizado à esquerda e à direita conforme equação abaixo¹⁰¹:

$$\Delta A = C \Delta \epsilon l \quad (4)$$

Onde o caminho óptico está representado pelo comprimento l e a variação no coeficiente de extinção por $\Delta \epsilon$.

A diferença de absorção das componentes circulares da luz, ora para esquerda (circunferência maior) e ora para a direita (circunferência menor), origina um vetor campo elétrico resultante polarizado elipticamente ($|E|$) conforme ilustrado a seguir:

Figura 25 - Representação da luz polarizada elipticamente após atingir a amostra quiral.

Fonte: FASMAN.¹⁰¹

O valor da elipticidade (θ) corresponde à tangente do raio do eixo menor da elipse e o ângulo α é a rotação óptica que equivale ao ângulo entre o eixo maior da elipse e o plano de polarização da luz plano polarizada inicial.¹⁰¹

As medidas de dicroísmo circular podem ser representadas pela elipticidade molar, dependente da concentração da proteína (C) e do caminho óptico (l) de acordo com¹⁰¹:

$$[\theta] \text{ (graus.cm}^2\text{/dmol)} = \theta / C l \quad (5)$$

O espectro de CD consiste de uma série de bandas que correspondem as transições eletrônicas de estados de menor energia para estados excitados considerando que, ao interagir com a matéria, a luz promove deslocamento de cargas. As informações quanto a estrutura secundária de proteínas são extraídas a partir da análise do espectro ultravioleta (UV) distante, de 180-260nm, devido ao grupamento amida das ligações peptídicas atuar como cromóforo¹⁰¹. As estruturas secundárias presentes em uma dada proteína possuem espectros característicos de CD (Fig. 26) que são utilizados para estimar a porcentagem de contribuição de cada tipo de estrutura secundária.

Figura 26 - Espectros de dicroísmo circular demonstrando as diferenças na elipticidade molar em relação à variação no comprimento de onda.

Fonte: Adaptada de GREENFIELD.⁹⁹

Antes de iniciar as medidas, uma importante etapa é a escolha do tampão da proteína pois, na presença de altas concentrações de sal, há interferência negativa no sinal da absorção da luz polarizada. Por isso as amostras de NgSPS2.CTD clivada com trombina e NgSPS2.FL após cromatografia de exclusão molecular e de afinidade respectivamente, foram dialisadas contra um tampão 20mM fosfato de potássio pH 8,0.

Na sequência 350 µl de cada proteína recombinante a 0,21 mg/mL (NgSPS2.FL) e 0,23 mg/mL (NgSPS2.CTD), em cubeta de quartzo de caminho de óptico de 0,1 cm, foram avaliados pelo espectropolarímetro JASCO J-810 [JASCO International Co. Ltd] acoplado a um sistema controlador de temperatura PELTIER PTC no Laboratório de Biofísica Molecular (IFSC-USP).

A técnica de CD foi empregada na tentativa de inferir o percentual de estruturas secundárias de NgSPS2.FL após sofrer processo abrupto de solubilização alcalina em comparativo com NgSPS2.CTD após clivagem com trombina.

3.2.10.4 Cristalização – estudo estrutural de NgSPS2.CTD

O processo de cristalização pode ser compreendido como a separação da proteína da fase líquida transitando em direção ao estado sólido no qual deve assumir um padrão cristalino ordenado, cuja transição ocorre em duas etapas tendo início com a nucleação e, na sequência, o crescimento dos cristais. Para o crescimento de cristais é necessário promover condições para que a amostra proteica ultrapasse o limite de solubilidade e dê início à supersaturação.¹⁰²

Dentre as técnicas usualmente aplicadas neste objetivo a estratégia de difusão de vapor é a mais utilizada e envolve a formação de um sistema fechado composto por solução de cristalização e uma gota contendo a proteína.¹⁰³ Considerando a concentração da gota ser maior do que a concentração do reservatório haverá difusão de vapor até que as concentrações se igualem.¹⁰³ Os dois sistemas clássicos utilizados para difusão de vapor estão ilustrados na figura 27.

Figura 27 - Componentes envolvidos nos dois métodos de difusão de vapor *sitting drop* (1) e *hanging drop* (2).

Fonte: Elaborada pela autora.

Em ambos os casos o reservatório é parcialmente completo com solução de cristalização da qual se retira uma gota para adicionar à solução de proteína. A gota da solução proteica em *hanging drop* foi depositada numa lamínula siliconizada e mantida suspensa no poço de cristalização, enquanto em *sitting drop* foi depositada no aparato especial de apoio. Ambos os sistemas foram vedados permitindo a difusão de vapor de água em direção ao reservatório (seta vermelha, Figura 27). Durante este processo as gotas tendem a supersaturar e a nucleação pode ocorrer.¹⁰³

Alterações na força iônica da solução, no pH, a adição de ligantes que alterem a solubilidade da proteína ou polímeros que aumentem o volume de exclusão durante a

separação de fases são alguns dos parâmetros avaliados no momento de determinar a condição adequada da solução de cristalização.¹⁰³

Neste sentido a triagem inicial foi realizada de modo automatizado pelo robô de cristalização “HoneyBee 939” (*Molecular Dynamics*) em colaboração com Dr. Humberto d’Muniz Pereira. A técnica de gota “sentada” (Figura 27-1) utilizada pelo robô envolveu o preparo de 96 diferentes condições de cristalização por placa utilizando 80µl da solução do reservatório e 0,7µl de proteína. Foram selecionados três Kits comerciais conforme a tabela a seguir:

Tabela 8 - Kits comerciais utilizados para triagem inicial da cristalização de NgSPS2.CTD

Fabricante	Código	Identificação
Hampton Research	HR2-130	<i>Crystal Screen HT</i>
	HR2-108	<i>Salt RX</i>
Qiagen-NeXtal	130704	<i>PEGs Suite</i>

Fonte: Elaborada pela autora.

As três placas de cristalização preparadas pelo robô permitiram a análise conjunta de três diferentes amostras de NgSPS2.CTD conforme indicado na figura 28.

Figura 28 – Esquema de uma placa de cristalização, método *sitting drop*. As gotas de cristalização (0,7µl de proteína com 0,7µl da solução precipitante) numeradas 1, 2 e 3 indicam, respectivamente, solução proteica de NgSPS2.CTD não clivada com trombina, NgSPS2.CTD após clivagem com trombina e NgSPS2.CTD clivada com tripsina.

Fonte: Elaborada pela autora

As três amostras avaliadas durante a cristalização foram obtidas em etapas diferentes da purificação de NgSPS2.CTD sendo a primeira delas produto da cromatografia por

afinidade, diálise e concentração A amostra foi dialisada para ficar em tampão de cristalização (20mM Tris, 50mM NaCl, 1mM β -mercaptoetanol pH 8,0) e foi concentrada à 10,42 mg/mL. A segunda amostra foi obtida após cromatografia de exclusão molecular, clivagem com trombina, dialise no tampão de cristalização e foi concentrada a 10 mg/mL.

A terceira amostra foi proveniente da proteólise *in situ* com a enzima tripsina. Para isso a proteína NgSPS2.CTD clivada com trombina foi purificada em cromatografia de exclusão molecular, o produto eluído foi dialisado com o tampão de cristalização e a amostra foi concentrada a 5 mg/mL. A reação de proteólise ocorreu com 100 μ g/mL de tripsina durante 5 minutos mantida a 20° C e foi interrompida com 1mM PMSF. Todas as placas ficaram em sala com temperatura controlada a 18° C.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 *Naegleria gruberi*: cultura, manipulação e ensaios imunoenzimáticos

4.1.1 Cultivo das células

A cultura de *N. gruberi* foi analisada inicialmente quanto à adequação aos meios de cultivo ATCC 1034 (ATCC ® 327-X™) e M7⁷¹ conforme descrito no tópico 3.1.1. cujo resultado proveniente de uma triplicata experimental está apresentado no gráfico a seguir.

Gráfico 1 - Resultado comparativo do cultivo de células amebóides de *N. gruberi* com meio de cultura ATCC 1034 modificado (linha vermelha) e Meio-M7 (linha preta) durante os nove dias de contagem celular. O gráfico foi obtido pelo programa Origin 8.6 (ORIGINLab). Os asteriscos indicam a significância estatística a partir do teste T de Student com valores classificados como $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**) e $p < 0,0005$ (***).

Fonte: Elaborado pela autora.

O perfil de crescimento revelado no gráfico 1 indicou um aumento do número de células cultivadas com ATCC 1034 suplementado com 10% de soro fetal bovino à 26° C. No

gráfico, o terceiro dia marcou o início das fases estacionárias e, neste ponto, o número de células mantidas sob ATCC 1034 foi $2,7 \pm 0,3$ vezes maior do que o número de células cultivadas em meio M7.

Os dados apresentados conduziram à padronização do cultivo de *N. gruberi* em meio ATCC 1034. Garrafas contendo 10 ml ATCC 1034 foram inoculadas com uma cultura de células ameboides na concentração final de 1×10^2 células/ml e a contagem de células foi feita em câmara de *Neubauer*. O gráfico 2 resume o perfil do crescimento incluindo a contagem, não só das células ameboides, mas também das formas naturalmente diferenciadas, flagelados e cistos.

Gráfico 2 - Resultado da curva de crescimento das células de *N. gruberi*. Dados plotados com Origin 8.6 (ORIGINLab) a partir da contagem de amebas (linha preta), cistos (linha azul) e flagelados (linha vermelha) durante as 356 horas de cultivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

O ponto médio da fase *log* para a curva das células amebóides foi utilizado para descobrir o tempo de dobra associado à replicação de *N. gruberi* cujo valor foi de aproximadamente 12 horas.

Na sequência as células entraram na fase estacionária (platô) cuja velocidade de crescimento foi mantida estável e o número de morte celular tende a igualar-se ao número de células viáveis. Ao final da curva, considerando a não reposição do meio de cultura, as células amebóides entram em fase de declínio. Neste caso grande parte dos trofozoítos diferenciou-se em cistos (curva azul).

Ao considerar o processo de divisão celular exclusivo da forma trofozoítica, o surgimento de flagelados e cistos é justificado pela transformação de uma célula, anteriormente ameboide, e que adquiriu flagelos ou foi encistada (linhas vermelha e azul, respectivamente, gráfico 2). Com isso a curva de crescimento foi reconstruída a partir do perfil descrito por amebóides incluindo as regiões em que duas formas coexistem em cultivo, conforme revelado no gráfico 3.

Gráfico 3 - Curva de crescimento para *N. gruberi* incluindo a predominância das formas amebóide, flagelado e cisto em cada fase do cultivo. O desenho de cada uma das formas acompanha a curva de crescimento representando a distribuição dos fenótipos ao longo da curva. A escala logarítmica do número de células auxilia a padronização da curva de crescimento.

Fonte: Elaborado pela autora.

A reapresentação da curva de crescimento unificando as três formas revelou predominância das formas amebóides no início do cultivo até o final da fase exponencial, em que algumas células se diferenciaram em flagelados coexistindo até a metade do platô. Neste ponto surgem os cistos e com prolongamento do tempo de cultivo passam a predominar em

solução o que fica evidente na fase de declínio para o número de células amebóides acompanhado pelo aumento do número de cistos.

Uma vez estabelecida a curva padrão de crescimento de *N. gruberi* em suas três formas (gráfico 3) foi possível determinar a faixa adequada para subcultivo e o tempo de dobra no número de células amebóides. Os próximos ensaios com cultura de células foram guiados a partir das informações adquiridas a partir desta padronização inicial.

4.1.2 Diferenciação celular

Ainda que as três formas de *N. gruberi* tenham sido encontrados naturalmente devido super população de células e esgotamento dos nutrientes do meio, em nenhum momento da curva (gráfico 3) foi obtida uma cultura homogênea para flagelados ou cistos, o que valida a importância dos testes de diferenciação celular. Os experimentos foram conduzidos a partir da variação nas condições físico químicas incluindo alteração no pH, temperatura e composição do meio de cultivo conforme detalhado no item 3.1.3. O resultado dos testes foi obtido por análise das imagens adquiridas ao longo do período de incubação.

O monitoramento completo da diferenciação resultou em inúmeras fotos, embora somente as imagens finais serão apresentadas. Os resultados para obtenção dos cistos foram positivos tanto para adição de 0,1% N-Lauril Sarcosina (método 1) como para o esgotamento dos nutrientes do meio devido manutenção da cultura durante nove dias sem repique (método 2) conforme revelado na Figura 29.

Figura 29 - Obtenção de cistos de *N. gruberi* a partir da adição de sarcosil (método 1) ou encistamento natural (método 2). As imagens de 1-4 para o método 1 foram adquiridas nos tempos 10, 40, 80 e 120 minutos, respectivamente. As fotos de 1-3 para o método 2 foram adquiridas após 120, 144 e 216 horas, respectivamente. No canto inferior esquerdo de cada imagem está indicado o desenho das formas amebóide e cística.

continua

continuação

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da diferenciação induzida com 0,1% N-Lauril sarcosina (sarcosil) ter resultado em cistos após 80 minutos de cultivo, foi revelado um efeito tóxico mesmo às formas de resistência após 120 minutos de cultivo (fotos 3 e 4 – método 1, Figura 29). O Sarcosil promove o desequilíbrio osmótico das células e faz com que amebas se protejam das condições adversas assumindo a forma de resistência, cística.⁷⁵ Além disso o surfactante tem potencial amebicida pois ao entrar em contato com a superfície da membrana plasmática desnatura a bicamada e provoca a lise dos trofozoítos.⁷

Contudo, não só as amebas foram lisadas, mas também os cistos o que ficou claro após 120 minutos de tratamento (Figura 29 -4). Este efeito impede o uso da cultura encistada em outros experimentos que necessitem das formas de resistência viáveis a longo prazo, e por isso o método foi descartado como possibilidade de diferenciação.

Por sua vez o método 2 resultou na obtenção de cistos viáveis após nove dias de cultivo, como disposto na sequência de fotos 1 a 3 da figura 29. Em comparativo à curva de crescimento estabelecida para *N. gruberi* (gráfico 3) foi detectada maior incidência de encistamento ao final do cultivo devido à correlação entre o esgotamento dos nutrientes, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e metabólitos prejudiciais ao crescimento das células o que favoreceu o surgimento da forma de resistência. Passados os nove dias de tratamento, a fim de garantir uma cultura mais homogênea para a presença de cistos, a porção em suspensão foi vertida em outra garrafa de cultura e possíveis amebas sobreviventes permaneceram aderidas ao fundo da garrafa anterior.

Após nove dias de cultivo o meio em suspensão foi repassado às novas garrafas e o resultado da contagem das formas de *N. gruberi* encontra-se resumida na tabela 9.

Tabela 9 - Resultado da contagem de células de três culturas diferenciadas a partir do método 2. A primeira coluna indica as três culturas utilizadas neste teste e, na sequência temos o número de células/ml e a porcentagem para os cistos e amebas.

Culturas	Cistos	Amebóides
1	230000 (98,9%)	2500 (1,1%)
2	247500 (100%)	0 (0%)
3	240000 (97,9%)	5000 (2,1%)

Fonte: Elaborada pela autora

De início o uso do método 1 teria sido preferível por promover rápida obtenção das formas encistadas mas, ao detectar a toxicidade do detergente também as formas de resistência, o método deixou de ser considerado.

Deste modo o método 1, embora mais demorado, foi capaz de promover a obtenção de uma fração homogênea de cistos conforme evidente na tabela 9 e foi selecionado como método padrão de encistamento.

Adicionalmente a estes estudos, uma das culturas encistadas a partir do método 2, foi utilizada para testar um método de desencistamento baseado na manutenção da cultura com 1% CO₂ a 28° C por uma hora. O aumento da concentração de CO₂ no interior das células levou a eclosão de alguns cistos que retomaram a forma ameboide logo nos primeiros 30 minutos de observação, conforme evidente na Figura 30. Após 60 minutos em câmara de CO₂, a cultura retornou a incubadora de cultivo (26° C sem influxo de CO₂) e as células completaram o processo de desencistamento.

Figura 30 - Resultado do desencistamento. As imagens 1 e 2 representam, respectivamente, a cultura após 30 minutos na presença de CO_2 e após 3 horas mantida sob condições normais para completar a eclosão.

Fonte: Elaborada pela autora.

A eclosão das formas encistadas (Figura 31-1) justifica-se devido ao influxo de água no interior da célula em resposta ao aumento na concentração de CO_2 ⁷².

Quanto aos testes realizados para enflagelamento as variações no cultivo envolveram manutenção da cultura em meio ATCC 1034, água destilada ou solução 2 mM Tris sob diferentes faixas de pH, opcionalmente na presença de sais conforme detalhado no item 3.1.3. O resultado qualitativo a partir da análise de imagens revelou presença de células enflageladas apenas nos testes cujo meio ATCC 1034 foi substituído ou por água ou solução 2 mM Tris, conforme indicado na Figura 31.

Figura 31 - Diferenciação celular para obtenção de *N. gruberi* na forma flagelada. As imagens 4.A e 4.A' representam o grupo das culturas mantidas em meio ATCC 1034 com adição de cinco sais (25 mM NaCl, KCl, CaCl₂, LiCl, ou MgCl₂). 7.1 e 6.1 representam o cultivo baseado na substituição de ATCC 1034 por 2 mM Tris (métodos 5 ao 7.1). Por último, 4.H e 4.H' são exemplares das células cujo meio ATCC 1034 foi substituído por água além da adição dos cinco sais. Neste caso 4.H e 4.H' contêm, respectivamente 25mM NaCl e 25mM MgCl₂ assim como 4.A e 4.A'. Os círculos em vermelho indicam a presença de uma ou mais células enflageladas.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 31 foi utilizada como guia para classificação de todos os resultados obtidos com os testes de diferenciação descritos na tabela 4 (item 3.1.3).

Visualmente foram reveladas duas categorias quanto a eficácia da diferenciação celular divididas entre o conjunto de tratamentos que não promoveu transformação de fase (grupo A representado por 4.A e 4.A') e o grupo de ensaios que provocaram enflagelamento (grupo B). Este último resultou em métodos de menor incidência de flagelados (subgrupo B.1 representado por 7.1 e 6.1) ou de maior incidência de células diferenciadas (subgrupo B.2 representado por 4.H e 4.H'). A análise comparada de todas as fotos permitiu o agrupamento dos métodos em uma das categorias descritas acima, cujo resultado foi resumido na tabela 10.

Tabela 10 - Resultado da diferenciação celular para os cinco métodos de enflagelamento. A categoria escolhida para cada ensaio foi feita comparando-se as fotos obtidas e o padrão revelado na Figura 31 que deu origem aos três grupos A (não promoveu diferenciação), B.1 (promoveu enflagelamento em poucas células) e B.2 (promoveu enflagelamento em muitas células).

Método	Categoria		
	Grupo A	Grupo B	
		B.1	B.2
3			X
3.1			X
4	4.A	X	
	4.H		X
4.1			X
5		X	
6		X	
6.1		X	
7		X	
7.1		X	

Fonte: Elaborada pela autora.

Considerando que, dentre os cinco métodos investigados, apenas 4.A foi mantido sob cultivo com ATCC 1034 e seu resultado foi o único que não promoveu diferenciação (grupo A), ficou clara a necessidade de substituir o meio ATCC 1034 para que ocorra o enflagelamento.

A tabela 10 indicou também que as células cultivadas com 2 mM Tris (teste 5 a 7.1, tabela 4) foram menos efetivas à diferenciação devido número reduzido de flagelados. Portanto os melhores resultados foram obtidos a partir da substituição de ATCC 1034 por

água destilada (3 e 3.1) ou água destilada na presença de sais (4.H e 4.1 e, dentre estes, o método escolhido como padrão para as diferenciações foi 4.1 baseado na adição de 20mM NaCl de acordo com a Figura 32.

Figura 32 - Flagelados de *N. gruberi*. Fotos obtidas após selecionado o melhor método de enflagelamento (4.1). As fotos 4.1a e 4.1b são ampliações da mesma cultura de células para a visualização do flagelo duplo.

Fonte: Elaborada pela autora.

A substituição do meio de cultivo ATCC 1034 por água destilada na presença de 20 mM NaCl (método 4.1.) promoveu a diferenciação incluindo as células completamente transformadas, com flagelo evidente, e formas em estágios incompletos de diferenciação que apresentam um movimento giratório em torno de si até alcançarem o completo desenvolvimento do aparato flagelar permitindo o nado impulsionado pelos flagelos.

A fim de confirmar a obtenção de uma fração homogênea para a presença de células enflageladas, duas garrafas foram submetidas ao método 4.1. na presença de 20 mM NaCl e a solução em suspensão foi repassada a duas novas garrafas de cultura cuja contagem de células, em câmara de *Neubauer*, resultou na tabela 11.

Tabela 11 - Resultado da contagem de duas culturas diferenciadas a partir do método 4.1 com 20mM NaCl. A primeira coluna indica as duas garrafas utilizadas neste teste e, na sequência temos o número de células/ml e a porcentagem para as células enflageladas e amebóides.

Culturas	Flagelados	Amebóides
1	215000 (90,5%)	22500 (9,5%)
2	235000 (89,5%)	27500 (10,5%)

Fonte: Elaborada pela autora.

Estudos associaram dois efeitos para presença de sais na solução de cultivo sendo a indução do enflagelamento⁸⁰ ou o controle, redução, no surgimento dos multiflagelares.^{84,105}

4.1.3 Obtenção dos extratos proteicos

A fim de analisar a presença de NgSPS2 no extrato proteico total das células diferenciadas foram testados cinco métodos a partir de culturas ameboides conforme descrito no item 3.1.2. Foram utilizadas culturas partindo do mesmo número de células, 1×10^6 total, que corresponde ao final da fase exponencial, e as frações resultantes dos cinco testes foram quantificadas pelo método Bradford⁸¹ para separação por SDS-PAGE 10% com a mesma quantidade de proteína, 40 μ g do extrato total. Após feita a eletroforese e a transferência para membrana de nitrocelulose, a mesma foi corada com *Ponceau* para verificar a eficácia de cada teste, conforme Figura 33.

Figura 33 - Avaliação dos métodos de extração proteica. Membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) corada com 0,2 % *Ponceau*. Da esquerda para a direita: Marcador molecular (*Spectra*TM Multicolor Broad Range Protein Ladder - Life Technologies); amostras de extrato proteico de *N. gruberi* lisado sob cinco diferentes métodos baseados no tampão RIPA (colunas 1-3) ou Laemmli (colunas 4 e 5).

Fonte: Elaborada pela autora

Considerando a aplicação da mesma massa de extrato total em cada canaleta do gel, os métodos 2 e 4 forneceram bandas mais expressivas em relação aos três outros métodos a partir da análise qualitativa da membrana de nitrocelulose (Figura 33). Contudo uma das etapas empregadas pelo método 4 envolveu fervura do extrato total o que nos fez escolher pelo método 2, cujo protocolo não incluiu a exposição das proteínas às altas temperaturas.

Determinado o melhor protocolo de extração proteica a partir de uma cultura de células ameboides, este foi aplicado às culturas enflageladas e encistadas para uso em experimentos de *Western Blot* sob incubação com os anticorpos *antiNgSPS2.FL* e *antiNgSPS2.CTD*.

4.1.4 Anticorpos *antiNgSPS2.FL* e *antiNgSPS2.CTD* e *Western Blot*

Os primeiros ensaios foram conduzidos para determinar o título adequado de cada soro a fim de obter sinal específico entre antígeno e anticorpo através da técnica de *Western Blot* (item 3.1.5).

As amostras imobilizadas na membrana de nitrocelulose provêm da extração proteica total de culturas ameboides a partir do método RIPA estabelecido anteriormente. O procedimento completo envolvido no *Western Blot* encontra-se detalhado no item 3.1.5. e, inicialmente foram escolhidos valores exploratórios para diluição dos anticorpos incluindo títulos de 1:500, 1:2000, 1:5000 e 1:10000. O perfil obtido nesta triagem resultou na detecção da proteína nativa em uma das quatro concentrações conduzindo à otimização da diluição.

Por exemplo, para *antiNgSPS2.FL* o *Western Blot* inicial indicou baixa titulação devido o reconhecimento da proteína nativa com 1:500 do anticorpo. Então o ensaio imunoenzimático seguinte envolveu teste dos títulos 1:650 – 1:1150. A figura 34 contém o resultado obtido comparativamente entre os soros imune e pré imune.

Figura 34 – Membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) reveladas após triagem de titulação para *antiNgSPS2.FL*. As colunas representam inicialmente o padrão de massa molecular seguido por canaletas de número ímpar (incubadas com soro imune) e número par (incubadas com soro pré imune). A - contém a titulação 1:650 (colunas 1 e 2), 1:750 (3 e 4), 1:850 (5 e 6) e 1:950 (7 e 8). B - apresenta as diluições de 1:1050 (1 e 2) e 1:1150 (3 e 4). As setas vermelhas indicam as bandas referentes à *NgSPS2*.

Fonte: Elaborada pela autora

O anticorpo *antiNgSPS2.FL* demonstrou-se específico à uma proteína próxima a 50 kDa conforme evidente pela banda única nas colunas de número ímpar (Figura 34). A diluição selecionada para continuidade das análises foi de 1:1050.

Adicionalmente, a ligação entre o anticorpo e o peptídeo em questão foi confirmada a partir do comparativo com as amostras do soro pré imune. Ou seja, caso *antiNgSPS2.FL* estivesse hibridizando de modo inespecífico com o extrato proteico de *N. gruberi* as frações incubadas com o soro pré imune (canaletas de número par) deveriam conter a mesma banda visualizada nas frações incubadas com o soro imune.

A determinação do título de *antiNgSPS2.CTD_(c.t.)* permitiu selecionar a diluição 1:5000 a partir do primeiro *Western Blot* exploratório. Com isso, três novas concentrações foram reavaliadas (1:3500, 1:4500 e 1:5500) em busca de otimizar a especificidade entre *antiNgSPS2.CTD* e a proteína nativa. 40µg do extrato proteico total de uma cultura ameboide foi aplicado em cada canaleta do gel poliacrilamida 10% e o *Western Blot* foi realizado incubando-se as quatro primeiras canaletas com soro imune *antiNgSPS2.CTD_{c.t.}* e as quatro últimas com o soro pré imune, conforme resultado da Figura 35.

Figura 35 - Teste de titulação de *antiNgSPS2.CTD*. Membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience). A primeira canaleta contém o padrão de massa molecular (*Spectra Broad Range Multicolor*) seguida pelos extratos proteicos ameboides incubados com 1:4000 (coluna 1), 1:5000 (2), 1:5500 (3) e 1:6000 do soro imune *antiNgSPS2.CTD* e, os extratos proteicos de 4 a 6 foram incubados com 1:4000; 1:5000 e 1:5500 do soro pré imune. A seta vermelha indica a banda referente à proteína NgSPS2. (*Western Blot 2*, tabela 5, item 3.1.5)

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 35 revelou melhor diluição de 1:4000 a partir da especificidade entre *antiNgSPS2.CTD* e uma proteína com massa molecular próxima a 50 kDa de modo semelhante ao anticorpo *antiNgSPS2.FL*. Deste modo, caso NgSPS2 nativa estivesse presente no extrato proteico total em sua forma inteira (Metiltransferase-SPS), condizente com a ORF codificadora para uma proteína de 737 aminoácidos, deveria ser detectada uma proteína na altura próxima a 80,4 kDa, diferente dos resultados apresentados até o momento.

Considerando que o anticorpo *antiNgSPS2.CTD* foi produzido a partir da purificação *in vitro*, o reconhecimento dentre o *pool* do extrato proteico de *N. gruberi* deve ser específico às regiões imunogênicas apenas do domínio C-terminal de NgSPS2. Estes dados podem indicar que, *in vivo*, os domínios metiltransferase e SPS2 possam estar separados, o que justifica a massa próxima a 50 kDa. Corrobora esta informação, os resultados obtidos para *antiNgSPS2.FL*.

4.1.5 Avaliação comparativa de NgSPS2 nas três formas de *N. gruberi*

Estabelecidos os protocolos de diferenciação para as fases cística e flagelar, culturas de *N. gruberi* em forma ameboide foram cultivadas e submetidas ao método 2 para captura de uma fração homogênea de cistos e ao método 2.1, na presença de 20mM NaCl, para obtenção das formas flagelares. As frações resultantes de cada diferenciação, adicionadas a uma cultura de trofozoítos, foram utilizadas para extração proteica total a partir da lise com tampão RIPA. Após a quantificação com uso do Kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific), 40µg total de cada extrato foi aplicado em gel poliacrilamida 10% utilizado no *Western Blot* comparativo (Fig. 36).

Figura 36 - Membrana nitrocelulose (Hybond ECL Amersham Bioscience) revelada após *Western Blot* comparativo identificando NgSPS2 nas três formas de *N. gruberi*. A primeira coluna contém o marcador de massa molecular seguido por nove extratos proteicos sendo três de amebas (1,2 e 3), três de flagelados (4, 5 e 6) e três de cistos (7, 8 e 9). A aplicação tripla de cada extrato permitiu incubar, separadamente, as fitas da membrana com 1:600 (canaletas 1, 4 e 7), 1:900 (2, 5 e 8) e 1:1000 (3, 6 e 9) do anticorpo primário *antiNgSPS2.FL*. Novamente, as setas indicam a banda que possivelmente corresponde à proteína inteira (metiltransferase-SPS) e a banda referente aos domínios C e N-terminal sobrepostos no gel.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise da Figura 36 apontou a presença de NgSPS2 nas três formas de diferenciação celular devido a detecção da proteína próxima a 50 kDa em todas as colunas da membrana. A especificidade do anticorpo pode ser confirmada a partir da faixa de diluição escolhida neste experimento em comparação com os títulos inicialmente utilizados para extrato proteico ameboide incubado com *antiNgSPS2.FL* (Figura 34, item 4.1.4). Os extratos de células flageladas (canaletas 4 a 6) mostraram diminuição na detecção da proteína nativa com o aumento da titulação. Considerando a aplicação da mesma massa de proteína (40 µg

total) em todas as colunas do gel é possível interpretar redução nos níveis de expressão de NgSPS2 quando ocorre diferenciação para fase flagelar.

Os extratos flagelados revelaram ainda uma banda superior, próxima a 100 kDa, visível com maior intensidade na forma flagelada na diluição de 1:600 (coluna 4 da figura 36) A forma de cistos apresenta a mesma banda de 100 kDa em proporção menor do que em Flagelados, porém a forma amebóide não foi possível detectar a banda referente a fusão metiltransferase-SPS. Mas a banda referente a SPS possui intensidade semelhante entre as três formas. Isso pode indicar uma diferença na velocidade de processamento da proteína.

Os dados apresentados para este *Western Blot* permitiram o levantamento de duas discussões. A primeira é condizente com a hipótese proposta no item 4.1.4. que considera a clivagem de NgSPS2 em seus domínios N- e C-terminal, porém o escopo qualitativo da análise não revela o ponto exato da clivagem. Deste modo podem ser gerados dois fragmentos proteicos com massa semelhante e portanto intimamente próximas no perfil eletroforético ou massas visivelmente díspares após a eletroforese. Considerando que não foi detectada uma segunda banda abaixo de 50 kDa surgiu a necessidade de aumentar o período total da eletroforese a fim de ampliar a resolução do perfil proteico no gel acrilamida 10% e possivelmente identificar reatividade de *antiNgSPS2.FL* com mais de um peptídeo no extrato total o que justificaria a clivagem dos domínios N e C terminais.

A segunda interpretação refere-se ao título menos diluído de *antiNgSPS2.FL* para os extratos proteicos de flagelares e cístico (Figura 36). Nestas colunas a presença da banda adicional na região de 100 kDa revelou um sinal próximo do esperado para a proteína nativa *NgSPS2 full lenght*, com os domínios integralmente fusionados o que permite associar conservação da proteína inteira apenas nas fases diferenciadas. A intensidade relativa de cada banda presente na forma flagelada (Figura 36) sugere a predominância de *NgSPS2* clivada ao invés da conformação original com os domínios fundidos.

Para aprofundar as investigações apontadas acima foram realizadas três novas imunodeteções comparativas entre as fases de *N. gruberi*. O tempo total da eletroforese foi aumentado para 140 minutos e os extratos foram incubados com os dois anticorpos. A Figura 37 apresenta os resultados de três experimentos de *Western Blot* conforme metodologia descrita no item 3.1.5.

Figura 37 - Avaliação de NgSPS2 nativa em extratos de cistos, amebas e flagelados. Membranas de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham Bioscience) A, B e C correspondentes aos experimentos de *Western Blot* 5, 5.1 e 4 da tabela 5, item 3.1.5. A primeira coluna de cada membrana contém o padrão de massa molecular. A - aplicação de 40µg total das proteínas obtidas em formas amebóide (colunas 1 e 4), flagelados (2 e 5) e cístico (3 e 6) incubadas com o soro imune (colunas 1 a 3) ou pré imune (4 a 6) de antiNgSPS2.FL na diluição 1:1000. B - exatamente o mesmo padrão de amostras que a membrana A, porém o título escolhido foi de 1:1150 antiNgSPS2.FL. C - 40µg total do extrato proteico de células amebóide, cística e flagelada nas colunas 1, 2 e 3 respectivamente e foi incubado com soro imune antiNgSPS2.Ctd na diluição 1:4000.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados expostos na figura 37 revelaram a presença de banda dupla nos dois primeiros experimentos de *Western Blot* incubados com *antiNgSPS2.FL* em alturas muito próximas, cuja separação só ficou evidente após o prolongamento do tempo total da eletroforese.

Retomando a discussão anterior quanto ao ponto de clivagem de NgSPS2 nativa, a figura 37 indica que as proteínas resultantes possuem massas muito próximas sendo detectadas separadamente. Em concordância, o resultado apresentado na membrana C revelou banda única devido incubação dos extratos com *antiNgSPS2.CTD* cuja reatividade é específica somente ao domínio C-terminal.

Além disso, houve reconhecimento entre proteínas do extrato total e o soro pré imune de *antiNgSPS2.FL* apenas no *Western Blot A* cuja titulação foi menos diluída enquanto que o aumento de 1,5 vezes na diluição do soro no experimento B não detectou tais bandas do soro pré imune refletindo maior especificidade do anticorpo.

Novamente as três fases de *N. gruberi* revelaram a presença de NgSPS2 nativa porém com o diferencial da separação entre duas bandas muito próximas. Quanto à proteína na região de 100 kDa para as formas flagelar e cística, revelada anteriormente (Figura 36), deixou de ser visualizada na Figura 37 devido ao aumento do título (1:1000 e 1:1500), insuficiente para detectar uma proteína possivelmente menos predominante no extrato total.

Os resultados obtidos com os experimentos anteriores confirmam a hipótese de que ao ser traduzida, NgSPS2, têm seus dois domínios NgSPS2.NTD e NgSPS2.CTD separados. Experimentos adicionais para confirmar estes resultados, como imunoprecipitação da proteína com o uso de *antiNgSPS2.CTD* seguido da espectrometria de massas e quantificação dos mRNAs em cada fase (cistos, ameboides e flagelares) através da técnica de qPCR poderão ser realizados no futuro para confirmar a discussão proposta.

4.1.6 Suplementação com selenito de sódio

A investigação das selenoproteínas no equilíbrio redox tem sido avaliada a partir da suplementação de cultura de células com compostos de selênio que favoreçam a via de selenocisteínas ou, devido aos níveis elevados, apresentem citotoxicidade ao microrganismo através de alterações na síntese das selenoenzimas.⁴¹

Motivados pela investigação do perfil de crescimento de *N. gruberi* em resposta à suplementação com selênio o primeiro teste exploratório envolveu a avaliação de uma cultura de células em placa de 12 poços suplementada com onze diferentes concentrações de selenito de sódio (Fig. 22, item 3.1.6). As concentrações mais elevadas (C1-C4 da Fig. 22) revelaram diminuição na população de células, evidente após 72 horas de cultivo, e os valores intermediários de selenito de sódio (A2-B4) resultaram entre evidente contraste visual para a diminuição no número de células até a ausência de contraste quando comparados à cultura

controle. Estes dados motivaram a reavaliação das mesmas concentrações sob cultivo das células em garrafa de cultura ao invés de placa de 12 poços incluindo uma abordagem quantitativa nas análises (Fig. 23, item 3.1.6).

Para tanto 6.10^4 células em meio ATCC 1034 foram tratadas com dosagem crescente de selenito de sódio de 3 μM a 500 μM em triplicata. O experimento foi monitorado por contagem do número de células em câmara de *Neubauer* a cada 12 horas (detalhes no item 3.1.6) como mostrado no gráfico 4.

Gráfico 4 – Curvas de crescimento das culturas de *N.gruberi* suplementadas com selenito de sódio. O retângulo preto na parte superior direita de cada gráfico contém a dosagem seriada do selenocomposto, em μM e as cores correspondem às curvas representadas.

continua

continuação

continua

continuação

Fonte: Elaborado pela autora.

O gráfico 4 revelou dois comportamentos principais quanto ao crescimento das culturas de modo que o primeiro conjunto (3 a 10 μM selenito de sódio) revelou curvas muito semelhantes ao grupo controle e o segundo grupo (10 a 500 μM) diferiu visualmente da curva padrão de crescimento demonstrando efeito mais severo ao ciclo de *N. gruberi*, relações estas que foram destacadas no último gráfico. Houve redução visível na viabilidade das células em concentrações elevadas de selenito de sódio ($\geq 15\mu\text{M}$), conforme evidente no gráfico 4 para trofozoítos. Aproximadamente entre 121 e 144 horas de cultivo o conjunto de células suplementado com 25 a 100 μM selenito de sódio sofreu queda abrupta no número de células ao final do crescimento exponencial (gráfico 1) concomitante ao aumento do número de cistos (gráfico 3).

A maior proporção de células enflageladas ocorreu com baixas concentrações do selenocomposto, porém em todas as condições a fração total de células flagelares em comparativo com as outras duas formas foi muito reduzida e a duração da forma enflagelada bastante curta. O efeito letal de selênio foi observado com a dosagem de 500 μM selenito de sódio para as três formas.

A redução severa no número de células após o crescimento exponencial para os grupos suplementados com as maiores concentrações de selenito de sódio, próximo a 125 horas de tratamento, justifica-se por duas possíveis interpretações. Primeiro, pode estar havendo um atraso na resposta celular para presença de selênio de modo que as células demorem a assimilar todo o selênio do meio e devido ao seu acúmulo, dependente do tempo, o crescimento celular é inviabilizado.

Uma segunda hipótese, pela qual temos preferência, considera a rápida percepção das células à presença de selênio ativando os mecanismos de defesa às altas concentrações do composto o que mantém o crescimento relativamente normal até o final da fase exponencial. Porém, passado um certo tempo, o acúmulo de selênio satura os mecanismos de detoxificação levando as células à apoptose ou ao encistamento, como forma de proteção.

Esta segunda interpretação é justificada ao considerar que a toxicidade de selênio provém de sua habilidade pró oxidativa em catalisar a oxidação de grupos tiol gerando, simultaneamente, radicais superóxidos responsáveis pela promoção do estresse oxidativo celular.⁴¹ Testes com a suplementação de selênio em linhagem celular de queratinócito de ratos demonstraram o efeito citotóxico de selenito e a significância estatística foi observada com as dosagens mais elevadas do selenocomposto conduzindo à apoptose celular.⁴¹

Em complemento, para avaliar possíveis alterações morfológicas associadas à suplementação com selenito de sódio foi feito monitoramento visual das células ameboides a partir da aquisição de imagens e a Figura 38 mostra o resultado comparado para o perfil fenotípico de cada cultura.

Figura 38 - Análise fenotípica das células de *N. gruberi* na presença de selenito de sódio. Todas as fotos foram adquiridas com o mesmo tempo de incubação (após 140 horas de cultivo). Os números de 1 a 8 representam, respectivamente, a amostra controle não suplementada com selenito seguida por culturas cujo selenocomposto foi adicionado nas concentrações de 3, 5, 10, 15, 25, 50 e 100 μM .

continua

continuação

Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 38 mostra claramente uma variação na morfologia e tamanho das células de acordo com aumento na dosagem de selenito de sódio. Nas fotos de 1 a 3 (0 - 5 μM) há predominância da forma ameboide incluindo algumas células flageladas em suspensão. A foto 5 (15 μM) apresenta células ameboides em maior proporção com alguns cistos em suspensão. A partir 25 μM de selênio o número de trofozoítos diminuiu acompanhado do aumento no número de cistos o que ficou ainda mais claro nas concentrações de 50 μM e 100 μM . O perfil fenotípico revelado na Figura 38 foi condizente com o padrão observado nas curvas de crescimento (gráfico 4, de 1 - 4) e confirma a toxicidade das dosagens elevadas de selenito, responsáveis pela indução do encistamento.

Associando os resultados da figura 38 com as discussões propostas para a curva de crescimento surge uma nova interpretação baseada na característica diferencial de NgSPS2 em relação as outras selenofosfato sintetase homólogas, seu domínio N-terminal identificado codificando para uma metiltransferase. Estudos prévios, em nosso grupo de pesquisa, conduziram a suplementação de selenito em cepas de *E.coli* deficientes em SelD endógena (*E.coli* WL400 λDE3) e, a partir da transformação destas cepas com o domínio

metiltransferase (NTD), foi observada maior resistência destas células (WL400/*NgSPS2*.NTD+) a níveis elevados de selênio em comparativo com o controle negativo (WL400/*SelD*-/*NgSPS2*.NTD-).⁵⁶

O mesmo estudo revelou que a transformação da cepa com selenofosfato sintetase inteira (WL400/*NgSPS2*.FL+) potencializa ainda mais a resistência das células aos níveis de selênio.⁵⁶ Os autores sugeriram portanto a ocorrência de uma ação simultânea entre o domínio C-terminal envolvido na produção das selenoproteínas responsáveis pelo balanço redox em associação a função do domínio N-terminal atuante na metilação dos compostos tóxicos de selênio conforme sua concentração intracelular é aumentada.⁵⁶

Deste modo, o crescimento celular praticamente inalterado para a cultura de *N. gruberi* enriquecida com 3 - 10 μM de selênio é coerente com a interpretação de uma ação conjunta entre o domínio C-terminal (*NgSPS2*.Ctd) que atua na biossíntese de Sec aumentando a presença de selenoproteínas responsáveis pela manutenção do equilíbrio redox em associação com o domínio N-terminal que capta a fração excedente de selênio e ameniza seu efeito tóxico.

4.1.7 Indução do estresse oxidativo

A fim de investigar os níveis de expressão de *NgSPS2* quando a cultura de *N. gruberi* é exposta às condições de estresse, trofozoítos na fase exponencial a $6,4 \cdot 10^5$ células/ml foram submetidas a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio (de 290 a 1160 μM) conforme detalhado no item 3.1.7. em triplicata e acompanhada por contagem de células em câmara de *Neubauer*.

A partir dos resultados apresentados no item 4.1.6. para a suplementação da cultura com selenito de sódio, uma das interpretações propostas considerou que em baixas concentrações o selenocomposto atua como doador de selênio para biossíntese de selenoproteínas responsáveis pela manutenção do balanço redox celular o que aumenta a resistência aos danos da oxidação. Neste sentido, a fim de investigar o efeito do enriquecimento de selênio em células sob estresse oxidativo, testamos o efeito do estresse oxidativo na presença de selenito (10 μM).

Todas as culturas foram monitoradas a cada 12 horas durante o período total do tratamento, 48 horas, e os resultados estão representados em cada um dos gráficos a seguir.

Gráfico 5 - Crescimento comparado entre as culturas de *N.gruberi* tratadas com peróxido de hidrogênio em diferentes concentrações na presença ou ausência de 10 μ M selenito de sódio. Os oito primeiros gráficos apresentam a dosagem de 290 a 870 μ M H₂O₂ e o último gráfico refere-se à 1,16 mM H₂O₂. Em cada condição foram desenhadas três curvas indicando, respectivamente, a cultura controle (preta) e as culturas tratadas com H₂O₂ na presença (contínua) ou ausência (tracejada) do selenocomposto. * indica diferenças significativas a p<0,05 pelo teste T de Student. A hipótese nula foi a ausência de diferença entre os conjuntos de dados.

continua

continuação

Fonte: Elaborado pela autora.

O gráfico 5 mostra que todas as concentrações de H_2O_2 testadas provocaram estresse capaz de reduzir o número de células em comparativo com o controle negativo (linha preta de cada gráfico) e a condição cujas culturas foram mantidas sob 1160 μM demonstrou morte celular, confirmando o efeito letal de altas concentrações de peróxido. Estudos associam o potencial de H_2O_2 como agente oxidante devido aos radicais peróxido gerados quando o composto entra em contato com a célula, tornando-o fonte de radicais livres que geram os danos a membrana celular¹⁰⁷. Este efeito é dose dependente. A diferença significativa entre as células mantidas com H_2O_2 na presença ou não de selenito tornou-se evidente com o prolongamento do tratamento, próximo a 48 horas.

Para as condições entre 290 e 870 μM de H_2O_2 , houve um efeito de proteção ao estresse oxidativo pela suplementação com selenito em relação as culturas não suplementadas. Estes dados precisam ser repetidos para confirmar sua significância. Caso confirmadas, tais observações sugerem que as células resistem melhor ao estresse oxidativo quando enriquecidas com selênio, de acordo com dados na literatura quanto ao efeito antioxidante de

selenito assumindo sua atuação como um sistema não enzimático de reparo aos danos oxidativos.¹⁰⁷

Para investigar a correlação entre este aumento na resistência ao estresse e a contribuição de selenito como indutor da síntese de selenoproteínas, as células foram centrifugadas, após 48 horas, para analisar os níveis de expressão de NgSPS2 (Figura 39).

Esta abordagem foi conduzida com a amostra enriquecida com 500 μM selenito de sódio e antiActina (Sigma) foi utilizado como controle interno para o comparativo da expressão.

Figura 39 - Análise de *Western Blot* para comparativo entre a expressão de NgSPS2 em células de *N. gruberi* estressadas com peróxido de hidrogênio na presença ou ausência de 10 μM selenito de sódio. Ambas as membranas contêm 40 μg do extrato proteico total referente as células mantidas com 500 μM H_2O_2 (canaletas 1 e 3) e referente as culturas que, além de 500 μM H_2O_2 , foram enriquecidas com 10 μM selenito de sódio (canaletas 2 e 4). A primeira membrana (A) foi incubada com *antiNgSPS2.FL* e a segunda membrana (B) com *antiActina*. A primeira canaleta de cada membrana corresponde ao marcador molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

A expressão diferencial de NgSPS2 foi aferida a partir da detecção da intensidade de cada banda da membrana através do *software Image Studio (C-Digit)* capaz de fazer a quantificação do sinal cujas medidas foram aqui expressas em porcentagem. Os valores obtidos para a intensidade das bandas de actina, controle do experimento, revelaram que a amostra 3 (sem selenito) está 8% mais intensa que a amostra 4 (com selenito) então este valor foi utilizado para normalizar as intensidades das bandas de NgSPS2.

Os valores obtidos para NgSPS2 revelaram expressão diferencial para a proteína entre as duas culturas devido ao sinal 30% maior para a amostra enriquecida com selenito de sódio (Figura 39 - 2), indicando que esta condição favorece o aumento na expressão de NgSPS2.

Este resultado, apesar de pouco expressivo, se confirmado, reforça a hipótese da atuação do selenocomposto na ativação da via de biossíntese de selenocisteína.

O acréscimo na taxa de expressão de NgSPS2, visível na figura 40, auxiliou também no aumento da viabilidade das células (gráfico de 500uM H₂O₂, Figura 34) e concorda com os dados na literatura que afirmam relação entre a produção de selenoproteínas e o combate ao estresse oxidativo.^{40,85}

Estudos conduzidos em nosso grupo mostraram que células de *Trypanosoma brucei*, cujo gene para SPS foi silenciado, são sensíveis ao estresse oxidativo⁸⁵ e corrobora os resultados obtidos com a cultura de *N. gruberi* sob estresse oxidativo.

4.2 Análises proteicas

4.2.1 Análise das proteínas NgSPS.FL e NgSPS.CTD – Bioinformática

A análise computacional da sequência de aminoácidos de SPS2 de *N. gruberi* foi feita inicialmente utilizando-se o banco de dados UniProt que forneceu informações gênicas como fase aberta de leitura (ORF: NAEGRDRAFT_50824) com 2214 pb e informações proteicas incluindo a quantia de 737 aminoácidos para a proteína traduzida com massa estimada de 80,44 kDa. Duas regiões distintas foram identificadas sendo o N-terminal agrupado na superfamília das metiltransferases (*S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases*) e o C-terminal na superfamília das PurM (*PurM N-terminal domain-like* e *PurM C-terminal domain-like*).^{86, 87}

Em concordância com as informações acima, a sequência primária de NgSPS2 foi analisada a partir do programa SMART que indicou a presença de dois domínios conforme Figura 40.

Figura 40 - Predição de domínios conservados para sequência de NgSPS2 avaliada pelo servidor SMART. A linha numerada de 0 a 700 orienta o posicionamento dos domínios em relação à sequência completa dos 737 aminoácidos. A numeração ao final de cada traço pontilhado indica os resíduos iniciais e finais, respectivamente, para cada um dos domínios. Na porção superior foram indicadas as pontuações *E-value* correspondentes à predição. Também foi destacada nesta representação uma região com baixa identidade estrutural, dos aminoácidos 326 a 369.

Fonte: Adaptada de SMART.⁷⁶

O servidor SMART identificou os domínios na região C-terminal agrupados nas famílias AIRS (Pfam PF00586) e AIRS_C (Pfam PF02769) cuja identidade correspondente, pela classificação SCOP, nomeia ambos os domínios como PurM (N- e C-terminal, respectivamente). Por sua vez a região N-terminal de NgSPS2 foi associada à metiltransferases S adenosil dependentes (Figura 40 - retângulo laranja). A fim de analisar bioquimicamente as funções dos domínios identificados, o NgSPS2.CTD e NgSPS2.FL foram expressos em células de *E. coli* e a sequência primária de resíduos de aminoácidos, para cada construção, foi avaliada pela ferramenta ProtParam (ExPASy) conforme informações sumarizadas na tabela 12.

Tabela 12 - Informações preditas para a sequência primária das proteínas recombinantes avaliadas pela ferramenta ProtParam (ExPASy). A primeira coluna apresenta a identificação das construções utilizadas durante a pesquisa e, na sequência estão o número de resíduos incluindo os aminoácidos provenientes do sistema pET, a massa molecular teórica e o coeficiente de extinção molar (ϵ) inferidos. As siglas n.c., c.t. e p.l significam, respectivamente NgSPS2.CTD não clivada com trombina, clivada com trombina e pós clivagem com tripsina.

Identificação	Nº de resíduos	MM _{teórica} (kDa)	ϵ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
NgSPS2.FL	895	97,5	5031
NgSPS2.NTD	508	55,9	3736
NgSPS2.CTDn.c.	578	61,3	2690
NgSPS2.CTDc.t.*	447	47,2	1295
NgSPS2.CTDp.l*	342	37,15	1295

Fonte: Elaborada pela autora.

Na tabela 12 as sequências destacadas com * designam produtos obtidos a partir da clivagem de NgSPS2.CTD_(n.c.). Os valores da massa molecular e coeficiente de extinção molar

foram utilizados em etapas de quantificação da proteína expressa e orientaram a análise do perfil eletroforético de cada proteína recombinante a partir das massas preditas.

A sequência de NgSPS2 foi submetida ao alinhamento local com auxílio das ferramentas BLASTp em conjunto com CDD para a busca de selenofosfato sintetase homólogas já descritas na literatura e para a análise de resíduos conservados, cujo resultado foi resumido na Figura 41.

Figura 41 - Representação da sequência primária de NgSPS2 analisada pelo servidor BLASTp. Os dois retângulos cinza na porção inferior da imagem refletem a conservação de domínios com similaridade à N e C-terminal de Selenofosfato Sintetase. O código de acesso CDD para ambas sequências é pfam13847 (Metiltransferase_31) e cl10019 (Superfamília PurM), respectivamente. Os números 1 e 2 representam dois conjuntos de resíduos conservados responsáveis pela ligação de NgSPS2 ao ATP e pela interface de dimerização, respectivamente.

Fonte: Adaptada de BLASTp.¹⁰⁶

Dentre todas as sequências alinhadas, algumas foram extraídas para um alinhamento múltiplo através do programa ClustalW e a tabela 13 indica o nome das sequências utilizadas incluindo os valores de similaridade, *Score* e *E-value* fornecidos pelo Blastp.

Tabela 13 - Parâmetros fornecidos pelo alinhamento local entre NgSPS2 e seis selenofosfato sintetases de microrganismos selecionados dentre todo o grupo alinhado. Na ordem estão os valores para o alinhamento com SelD de *Escherichia coli*, SPS2 e SPS1 humana, SelD de *Aquifex aeolicus*, SelD de *Leishmania major* e SelD de *Trypanosoma brucei* e SelD de *Methanococcus jannaschii*.

Identificador	Nome	Identidade	Score	E-value
P16456	SelD_E.coli	38%	254	2e-75
Q99611	SPS2.Human	32%	131	4e-25
P49903	SPS1_Human	28%	138	1e-28
O67139	SelD_Aquae	38%	229	4e-67
Q8MXD3	SelD_Leima	31%	165	1e-21
K2MBV1	SelD_Tryp	30%	156	7e-29
P60819	SelD_Metja	31%	167	2e-39

Fonte: Elaborada pela autora.

A sequência FASTA das proteínas da Tabela 13 foram alinhadas com NgSPS2 (D2VMQ3) através do programa ClustalW 2.0 a fim de identificar os sítios ativos e de ligação

ao ATP e cofatores, e sequências importantes à interface de dimerização conforme revelado em análises anteriores (Figura 41). A Figura 42 aponta algumas das regiões de maior importância no alinhamento.

Figura 42 - Alinhamento da sequência de aminoácidos de selenofosfato sintetase homólogas. Apenas regiões parciais do alinhamento estão indicadas na figura para destacar os resíduos de maior importância catalítica/estrutural. Representantes dos três domínios foram utilizados para análise sendo Eukarya (*Naegleria gruberi*, *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Homo sapiens*), Archaea (*Methanococcus jannaschii*) e Bacteria (*Escherichia coli* e *Aquifex aeolicus*). Os resíduos foram corados de acordo com a função que desempenham na proteína: verde para os resíduos envolvidos na interface de dimerização, vermelho para resíduos envolvidos na ligação a ATP e roxo para a alça N terminal flexível composta por cisteína (ou selenocisteína) e lisina com atividade catalítica. Os resíduos destacados em vermelho e verde, simultaneamente, estão envolvidos em ambas as funções de ligação ao ATP e interface de dimerização.

D2VMQ3_NAEGR	TGVASSCSSSISSSGVCFSSKKVSLNVNADNVKLTQLASGLCCSKINSRL	400
SELD_AQUAE	-----MVELLKLVRSSQUAKVGP	21
SELD_ECOLI	-----MSENSIRLTQYSHGACGCKISPKV	25
SPS1_HUMAN	-----MSTRESFNPESEYELDKSFRLTRFTELKCTGCKVPQDV	37
SPS2_HUMAN	GSSGPAGLT LGRSFSNYRPFEPQALGLSPSWRLTGFSGMKCUCKVPQEA	68
Q8MXD3_LEIMA	RPQSSAGESNGAVDLKTPRFDVSLGLPAEFQLTDYTRLKCCSKLPQPK	69
K2MBV1_TRYCR	N-----EVKAPRFNPTDVGLPPEFVLTDYTRLKCCSKLPQPK	42
SELD_METJA	-----MERGNEKIKLTELVKLHQUACKLPSTE	27
	* * * * *	
D2VMQ3_NAEGR	TCDDAAVYKINDH---VAIVSTIDFFAPIVDNPYDFGAIACANALSDY	468
SELD_AQUAE	IGDDAGVYEHNG----IIVVYTVDIITPVVNDPYLWGAISTANALSDY	85
SELD_ECOLI	TRDDAAVYDLGNG---TSVISITDDFFMPIVDNPFDFGRIATNAISDIF	93
SPS1_HUMAN	MDTCVIPLRHGG----LSLVQTTDYIYPIVDDPYMMGRIACANVLSLY	112
SPS2_HUMAN	MDSCVIPLRHGG----LSLVQTTDFFYPLVEDPYMMGRIACANVLSLY	163
Q8MXD3_LEIMA	MDCSIVPLHHTNSKGEALFLVSTTDFFPVSVDPLQGGQIGAAANVLSLY	137
K2MBV1_TRYCR	MDCSVVQLLQKDEHGAPLFMVSTTDFFPVSVDPLQGGQIAAANVLSLY	110
SELD_METJA	LGDDASIIKRNG----LVIAKTVDVFTPIVDDPYIQGKIAACNSTSDY	94
	* * * * *	
D2VMQ3_NAEGR	HSIDDEEPKFGMSVNGIIHPDKIFRNVG-CEEGDLLFLTKRIGTGIVTSA	563
SELD_AQUAE	HTIDDKPEKFGLSVAGICPEGKYITQSG-AQVGQLLILTKPIGTGILIKG	180
SELD_ECOLI	HSIDAPEPIFGLAVTGIVPTERVKKNST-AQAGCKLFLTKPLGIGVLTTA	188
SPS1_HUMAN	QTVLNPWIVLGGVATTVCQPNFIMPDN-AVPGDVLVLTPLGTQVAVAV	211
SPS2_HUMAN	QTVVNPWIIIGGVATVVCQPNFIMPDS-AVVGDLVLVLTPLGTQVAVNA	262
Q8MXD3_LEIMA	QTVMNPWPLIGGVAMAVVSEAEVVRPTGLLCAGDILVLTPLGQCQAVNL	237
K2MBV1_TRYCR	QTVMNPWPLIGGVATSVVTELEHVRPTG-LCIGDVLVLTPLGQNIAVNL	209
SELD_METJA	HTILNPWPLIGGAVTGVGREEEVLTAKG-VKVGDLVILTKPLGTQTAMAL	189
	::: * * * * *	
D2VMQ3_NAEGR	S-----VSSCTDVTGFGLLGHLKEIMKGSRE--ICEENKDLVAQLNAKQ	640
SELD_AQUAE	D-----ATACTDVTGFGLLGHAWNICK-----NSNIGARIFFEK	246
SELD_ECOLI	G-----VKAMTDVTGFGLLGHLSEMCQG-----AGVQARVDYEA	254
SPS1_HUMAN	-----AHAATDITGFGILGHAQNLAKQQRN-----EVSFVIHNLPLVA	297
SPS2_HUMAN	-----AHAATDITGFGILGHSQNLAKQQRN-----EVSFVIHNLPIIA	348
Q8MXD3_LEIMA	-----AHGATDVTGFGILGHANNFGAAQAVGDAPRSLCLVLERLPMFK	330
K2MBV1_TRYCR	-----AHGATDVTGFGILGHANNLAVAQEK-----EVCLLLETLPYK	297
SELD_METJA	ERVGDKIANALTDITGFGILGHSNEMAKNSNV-----LIEINLLPCIK	276
	* * * * *	

Fonte: Adaptada de ClustalW.⁹⁰

A localização dos resíduos conservados revela uma região rica em glicina GCGCKISP para *E.coli* (resíduos 391 a 395 de *N. gruberi*) composta por três aminoácidos conservados em todas as sequências homólogas sendo glicina (G16 de *E.coli*, G391 de *N. gruberi*) e lisina (K20 de *E.coli*, K395 de *N. gruberi*) resíduos catalíticos e a cisteína não catalítica (C19, *E.coli*, C394 de *N. gruberi*).⁶⁴ Em alguns casos o resíduo cisteína (C17, *E.coli*)⁶⁴ foi substituído por uma selenocisteína (U) conferindo às SPSs homólogas o caráter de selenoproteína como em *Aquifex aeolicus*, *Methanococcus jannaschii* e Humano.

Os resultados obtidos a partir da estrutura cristalográfica de *Aquifex aeolicus* também revelaram a importância dos resíduos Sec (U,13) e Lis (K, 16) como essenciais à atividade catalítica. O mesmo trabalho revelou que ambos localizam-se no início da região N-terminal rica em glicina, com flexibilidade inerente dos resíduos desordenados que permitem o dobramento deste segmento N-terminal para recobrir o sítio ativo de cada monômero.⁶²

Os resíduos conservados que participam da ligação a magnésio são importantes para viabilizar a interação com ATP, permitindo a atividade catalítica de SPSs.⁷⁷ Dois destes resíduos estão indicados na Figura 42 pela marcação com uma estrela amarela (D68 e D91 para *E.coli*) evidenciando sua conservação em todas as homólogas. A análise da estrutura cristalográfica de SPS de *A. aeolicus* revela a formação de um barril central formado por folhas β no N – terminal de cada subunidade que auxiliam para o ajuste do ATP no sítio de ligação ao ATP⁶² devido aos resíduos conservados (Figura 42 – marcação verde claro).

Os resultados obtidos a partir do alinhamento acima sugerem que NgSPS2 possui potencial de efetuar a catálise *in vivo* devido a presença dos resíduos catalíticos além dos sítios de acomodação ao ATP. Nossos resultados em cultura de células, demonstrando a separação entre o domínio correspondente à metiltransferase e o domínio de SPSs canônicas, condizem às informações extraídas *in silico* pois, para a formação do estado dimérico ativo de SPS a região N-terminal de cada monômero precisa ter espaço suficiente para a interação^{62,63}. Deste modo, a metiltransferase adicional pode desfavorecer a formação do estado dimérico de NgSPS2.CTD e por isso a sequência entre os domínios N e C-terminal de NgSPS2 sofre a clivagem.

A amplificação do fragmento gênico que codifica para a enzima selenofosfato sintetase de *N. gruberi* foi feita através da extração do RNA total de *N. gruberi*, produção do cDNA, amplificação do gene inteiro ngsp2.fl e da sequência gênica correspondente ao domínio C-terminal de NgSPS2 utilizando os oligonucleotídeos planejados e as respectivas enzimas de restrição internas à sequência.

Realizadas as clonagens no vetor comercial pET 32a(+) os plasmídeos foram transformados na cepa de expressão *E.coli* BL21 (λ -DE3) e validados por sequenciamento. Todas estas etapas foram conduzidas em pesquisa⁵⁶ anterior realizada em nosso grupo de pesquisa pelo Dr. Marco Túlio Alves da Silva. As células foram cedidas à presente pesquisa e foi dado início aos ensaios de expressão e purificação utilizando as construções para NgSPS2.FL e NgSPS2.CTD.

4.2.2 Análise da Proteína NgSPS2.FL

4.2.2.1 Expressão NgSPS2.FL

Como descrito na seção metodológica a produção inicial de NgSPS2.FL foi conduzida por meio do teste de expressão em sistema heterólogo a partir da variação de temperatura observada ao longo de 12 horas (Figura 43).

Figura 43 - Resultado do teste de expressão piloto para NgSPS2.FL. A - alíquotas que permaneceram sob indução à 37°C. B - células mantidas a 20°C. O marcador molecular MMM foi aplicado na primeira canaleta de cada gel. Na sequência temos a amostra antes da indução com IPTG e as alíquotas retiradas temporalmente durante as 12 horas.

continua

continuação

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado do teste de expressão de *NgSPS2.FL*, avaliado pelas bandas de proteína da Figura 43, permitiu escolher a temperatura de 20° C devido a obtenção de proteica em maior quantidade. Dentre o período total em que a indução foi monitorada o resultado evidenciou que a partir de 8 horas não há diferença significativa no rendimento da expressão, por isso este ponto foi selecionado (Figura 43-B). Deste modo foram padronizadas as condições de expressão incluindo: indução com 0,5 mM IPTG, previamente determinada, e manutenção das células à 20° C durante 8 horas de incubação.

Na sequência foi feita a expressão em larga escala a partir de 1L de meio de cultura cujas etapas de lise celular foram descritas na seção de materiais e métodos. Amostras coletadas ao final da centrifugação, após etapas de lise, foram aplicadas em SDS-PAGE 10% para análise eletroforética.

Figura 44 - Expressão em larga escala de *NgSPS2.FL*. Fração do precipitado (sedimento/insolúvel) e sobrenadante (amostra solúvel) após a lise e centrifugação. A banda evidente na segunda coluna revela a insolubilidade da proteína.

Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 44 apresentou a proteína de interesse na fração insolúvel, inapropriada para a continuidade das etapas de purificação.

Dentre os métodos mais utilizados à solubilização de proteínas estão: variações do tampão de lise com acréscimo de detergentes, processo de lise em *French press* ou alterações no ambiente químico do tampão como a solubilização alcalina⁹³. Motivados pela rápida produção de anticorpos para início dos ensaios imunoenzimáticos foi feita opção pela lise alcalina como teste inicial de solubilização de NgSPS2.FL.

4.2.2.2 Solubilização alcalina

O método de lise alcalina testado para solubilizar NgSPS2.FL envolveu três lavagens seriadas do sedimento com tampão de lise seguido pela adição de NaOH em sala refrigerada (4° C) e, na sequência, foi feita diálise para reestabelecer o pH 8,0 conforme detalhado em 3.2.3, seção metodológica. As amostras coletadas em cada passo da lise alcalina foram avaliadas via eletroforese desnaturante em SDS-PAGE 10% conforme Figura 45.

Figura 45 – Resultado da solubilização alcalina de NgSPS2.FL. Gel poliacrilamida 10%. A primeira canaleta contém o padrão de massa molecular M (kDa). Na sequência temos I₁ (fração insolúvel obtida após centrifugação, durante a primeira lavagem), I₂ e S₂ (frações insolúvel e solúvel, respectivamente, após o segundo passo de lavagem), I₃ e S₃ (insolúvel e solúvel para terceira lavagem), P.d (amostra resultante após a diálise), I_f e S_f (amostras insolúvel e solúvel após centrifugação final) e S_f' (mesma amostra S_f, em maior concentração).

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da Figura 45 indica que, ao final do tratamento, a solubilidade de NgSPS2.FL foi alcançada. A adição de NaOH demonstrou-se fundamental para tornar o ambiente químico altamente alcalino promovendo a alteração na carga total da proteína. A partir disso a amostra de interesse foi obtida na fração solúvel que foi conduzida à purificação em cromatografia de afinidade.

4.2.2.3 Cromatografia de afinidade

A fração solúvel de NgSPS2.FL proveniente da lise alcalina foi inicialmente pré clarificada em filtro 0,45µm e aplicada em resina de Ni-NTA Quiagen. As frações eluídas durante a etapa de purificação foram analisadas em SDS-PAGE 10% conforme apresentado na Figura 46 em conjunto com o cromatograma obtido.

Figura 46 - Cromatograma referente à purificação por afinidade e análise eletroforética das frações eluídas. A) Gel poliacrilamida 10% com marcador molecular (175 kDa; 80 kDa; 56 kDa) seguido pela amostra antes de ser aplicada na resina (3), amostra coletada durante o arraste na cromatografia (2) e amostra purificada após união do eluato (1). B) Cromatograma de NgSPS2.FL.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da Figura 46 revelou que a purificação de NgSPS2.FL foi obtida praticamente em um único passo cromatográfico. A pureza foi confirmada pela banda predominante, sob condições desnaturantes na altura próxima a 97 kDa (Figura 46 -A). O

cromatograma indicou que 24 % do tampão B foi suficiente para desligar a proteína da resina. Ou seja, na presença de 110 mM imidazol foi obtida a fração purificada.

O produto purificado, 10 ml a 1,8 mg/mL, foi dialisado para retirada do imidazol e concentrado por ultrafiltração em membrana Millipore. A concentração final obtida foi de 4,2 mg/mL em 600µl e foi observado início de precipitação proteica, justificado pela queda na concentração de amostra. O produto resultante foi então centrifugado para sedimentar os precipitados e 1 mg total foi aplicado em SDS-PAGE 10% conforme Figura 47 para envio para produção de antissoro policlonal no Laboratório de Imunologia (UFRGS – RS).

Figura 47 - Separação eletroforética do produto purificado em cromatografia de afinidade para coleta de NgSPS2.FL. O gel foi polimerizado sem a separação entre as canaletas permitindo a aplicação de volume maior de amostra (1,5 mg total).

Fonte: Elaborada pela autora.

A amostra restante da purificação, a 4,2 mg/mL, foi dialisada em tampão 20 mM fosfato de sódio pH 8,0 para ser analisada quanto integridade estrutural e padrão de enovelamento em espectroscopia de dicroísmo circular.

Entretanto, as análises biofísicas para investigação do comportamento da proteína em solução requerem amostras estáveis e solúveis. Motivados pela otimização da lise foi feita nova busca por procedimentos menos abruptos baseados na variação do tampão de lise.

4.2.2.4 Teste de solubilidade – Variação no tampão de lise

O balanço de cargas da proteína está intimamente relacionado à solubilidade e, a fim de investigar o efeito de hidrofobicidade associado à agregação proteica, foram feitos testes com detergentes aniônicos e catiônicos conforme descrito no item 3.2.34 da seção metodológica.

A Figura 48 apresenta todas as alíquotas resultantes de cada teste sob análise em SDS-PAGE 10.

Figura 48 - Análise de NgSPS2.FL após teste de solubilidade. No início de cada gel a coluna M(kDa) indica o marcador de massa molecular e os números de 1 a 7 representam, respectivamente, alíquotas solubilizadas com 10% glicerol (1), 1% Tween-20 (2), 20mM CHAPS (3), 1% N-Lauril sarcosina (4), 10% Nicodens (5), 1,5mM MgCl₂ (6) e 1% Triton X-100 (7). As siglas p.c., (S) e (I) representam, respectivamente, o lisado bruto pré centrifugar seguido pelas amostras obtidas nas frações solúvel e insolúvel.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado apresentado na Figura 48 demonstrou que a proteína foi solubilizada na presença dos detergentes 1% Sarcosil (canaleta 4_(S)), 1% Triton X 100 (canaleta 3_(S)) e 20 mM CHAPS (coluna 7_(S)). Além disso, a solubilidade não dependeu da adição de MgCl₂ descartando a hipótese de que a presença do íon em solução resolveria o possível mal enovelamento da proteína (coluna 6_(I)).

Este experimento, baseado no teste de diversos tampões de lise, permitiu definir os melhores aditivos capazes de solubilizar NgSPS2.FL a partir de um método menos agressivo se comparado à lise alcalina o que torna a proteína disponível para continuidade das purificações.

Considerando a realização, em paralelo, da melhoria nas condições de expressão e purificação do domínio C-terminal NgSPS2.CTD associada aos ensaios imunoenzimáticos e,

obtido o sucesso para solubilização de *NgSPS2.FL*, os esforços da pesquisa foram empregados nas investigações com o domínio C-terminal e nos experimentos em cultura de células.

4.2.3 Análise de *NgSPS2.CTD*

4.2.3.1 Expressão, purificação de *NgSPS2.CTD* e estimativa massa molecular

Ao longo desta seção serão apresentados resultados específicos para três variações do domínio C-terminal de *NgSPS2* sendo: *NgSPS2.CTD*_(n.t.) que corresponde ao domínio completo, não clivado com trombina, além das formas derivadas *NgSPS2CTD*_(c.t.) para a proteína clivada com trombina e, por último, *NgSPS2.CTD*_(p.l.) equivalente à proteína obtida após proteólise limitada.

De início a construção *NgSPS2.CTD*_(n.t.) clonada no vetor pET 32a(+) e transformada na cepa de expressão *E.coli* BL21 (λ -DE3) foi utilizada para expressão em larga escala utilizando protocolo estabelecido previamente por esforços anteriores à esta pesquisa, conduzidos pelo Dr. Marco Túlio Alves da Silva.

Assim, o gene foi produzido em sistema de expressão heteróloga com a indução da expressão a partir de 0,5 mM IPTG, incubação a 20° C, agitação 180 rpm, durante 6 horas. As amostras obtidas na etapa final após lise e centrifugação das células foram monitoradas, tanto para *NgSPS2.CTD*_(n.t.) como para o pET 32a(+), por separação eletroforética.

Figura 49 - Expressão de *NgSPS2.CTD*_(n.t.). SDS-PAGE 15% contendo, na primeira canaleta, o padrão de massa molecular (M kDa) seguido pelos números de 1 a 4 que indicam, respectivamente, as frações insolúveis para pET32a e *NgSPS2.CTD*_(n.t.) e as frações solúveis para pET32a e para *NgSPS2.CTD*_(n.t.).

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da Figura 49, canaleta 4, evidenciou a presença de *NgSPS2.CTD* na fração solúvel confirmando a eficácia dos protocolos de expressão e lise celular.

O produto da lise foi clarificado em filtro de 0,45µm e aplicado em cromatografia de afinidade, cuja eluição envolveu gradiente de imidazol. A Figura 50 apresenta o cromatograma obtido durante a purificação em conjunto com a análise eletroforética das amostras.

Figura 50 - Purificação de *NgSPS2.CTD*_(n.i) por cromatografia de afinidade. A: cromatograma indicando a eluição da amostra de interesse (linha preta) em comparativo com o aumento do tampão B (linha verde). B: SDS-PAGE 15%. A primeira coluna contém o marcador de massa molecular seguido pela numeração de 1 a 4 indicando, respectivamente, a amostra não ligada na coluna de níquel (VOID), a amostra insolúvel após expressão e lise de *NgSPS2.CTD*_(n.i), a amostra solúvel pré aplicação na resina e a fração eluída correspondente ao pico do cromatograma A.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da Figura 50 revelou a eluição de $NgSPS2.CTD_{(n.t.)}$ em pico único coletado com 35,2% (166 mM imidazol) do tampão B. Em complemento, a separação eletroforética evidenciou a purificação da proteína em banda única próxima a 61,3 kDa, canaleta 4 (Figura 50-B).

Após esta etapa de purificação por afinidade, $NgSPS2.CTD_{(n.t.)}$ foi obtida a 2,1 mg/mL em 18ml de amostra e dialisada a fim de retirar o imidazol. A amostra foi concentrada a 23,04 mg/mL e dividida em duas alíquotas que seguiram distintas etapas de purificação. Uma das amostras foi utilizada para obtenção do padrão cromatográfico por exclusão molecular investigando a massa e o estado oligomérico de $NgSPS2.CTD_{(n.t.)}$ antes de sofrer clivagem com trombina.

Foram aplicados 500 μ l (23,04mg/mL) em Superdex 200 10/300 GE. A figura 51 contém o resultado da purificação incluindo o cromatograma, a separação eletroforética das alíquotas correspondentes às frações eluídas e a curva de calibração cedida pelo aluno de doutorado Ivan Rosa e Silva para obtenção das informações analítica.

Figura 51 - Resultado da purificação de $NgSPS2.CTD_{(n.t.)}$. O cromatograma guiou a coleta das amostras eluídas em cada um dos picos cuja análise foi feita em SDS-PAGE 15%. Os números 8-26, nas canaletas dos géis, referem-se aos volumes de eluição 8-26ml do cromatograma. As letras A, B e C do perfil cromatográfico correspondem às frações avaliadas nos três géis. A amostra P.C. no gel A indica a fração de $NgSPS2.CTD_{(n.t.)}$ antes de ser aplicada na cromatografia. O marcador molecular (M) contém proteínas de tamanhos 175, 80 e 58 kDa respectivamente. D - Curva de calibração⁽¹⁾ Superdex 200 10/300 (GE) para estimativa da massa molecular de $NgSPS2.CTD$.

Fonte: Elaborada pela autora.

¹ SILVA, I. R. Estudos biofísicos da Selenofosfato Sintetase de Escherichia coli e investigação de seu papel na via de biossíntese de Selenocisteínas 2012. p. Dissertação(Mestre em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

De acordo com a Figura 51 o perfil cromatográfico revelou um pico em 13,44ml do tampão de eluição no qual *NgSPS2.CTD_(n.t.)* foi obtida, além de dois picos menores cuja concentração proteica foi muito baixa não sendo detectada banda de proteína no perfil eletroforético. Os picos revelados em A e C referem-se aos peptídeos contaminantes de maior e menor massa, respectivamente, que foram separados durante a cromatografia.

O cálculo da massa molecular foi extraído a partir da equação da reta obtida pela curva de calibração da coluna e o volume de eluição 13,44 ml foi equivalente a $122,5 \pm 12,8$ kDa que indica a presença de dímeros de *NgSPS2.CTD_(n.t.)* em solução, considerando massa molecular teórica de 62,3 kDa para o monômero. Estes resultados são coerentes com a literatura que descreve uma estrutura de homodimérico para as selenofosfato sintetases homólogas estabilizando as regiões hidrofóbicas e permitindo a atividade ATPasica.⁶⁴

O restante da amostra obtida ao final da cromatografia de afinidade, 800 μ l a 23,04 mg/mL, foi conduzido à clivagem com a protease trombina durante 12hrs à 20°C. A reação foi interrompida com 1 mM PMSF e a amostra foi concentrada por ultrafiltração em membrana Millipore. Com o objetivo de avaliar a massa molecular da proteína em solução após clivagem da extensão de histidinas a amostra obtida, 500 μ l a 18,4 mg/mL, foi aplicada em cromatografia de exclusão molecular. O resultado da purificação foi resumido na Figura 52 juntamente à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%.

Figura 52 - Resultado da purificação de *NgSPS2CTD*_(c.t.) em cromatografia de exclusão molecular. O perfil cromatográfico apresenta 3 principais picos de maior contribuição à absorbância representados pelas letras A, B e C. O SDS-PAGE 15% anexo a imagem contém, na primeira canaleta a fração pré cromatografia, seguido pelo marcador molecular com proteínas de massa 97,4; 66,2; 45; 31; 25,5 e 15 kDa. As colunas numeradas de 1 a 7 correspondem, respectivamente, à fração eluída com 11,18ml do tampão (1), amostras eluídas no pico A (canaletas 2-5), eluato dos picos B e C (6 e 7, respectivamente).

Fonte: Elaborada pela autora.

A confirmação da reação de clivagem com trombina foi positiva conforme indicado na primeira canaleta (P.C.) do gel poliácridamida (Figura 52) e as duas bandas de maior evidência, nas canaletas 1 – 7, correspondem a amostra de interesse (*NgSPS2.CTD*_(c.t.)) próxima a 45 kDa e a extensão de histidinas próxima a 15 kDa. O cromatograma revelou duas elevações menores que antecedem o pico principal, de maior absorbância, cujos volumes de eluição correspondem a 9,64 ml e 11,18 ml e o cálculo da massa molecular resultou em 685,6 kDa e 338,2 kDa, respectivamente. Considerando a massa teórica da proteína após a clivagem e retirada da extensão de histidinas (42,7 kDa) é possível inferir a presença de estados oligoméricos de maior massa contribuindo a absorbância detectada em 11,18 ml de eluição, equivalente à massa teórica para octâmeros (341,6 kDa).

O resultado da Figura 52 reflete o estado dimérico de *NgSPS2.CTD*_(c.t.) em solução devido ao pico de maior absorbância (A), volume de eluição 13,89 ml, que forneceu massa calculada de 100 ± 10 kDa condizente com a massa teórica para o dímero (94,4 kDa). Os dois últimos picos (B e C) obtidos no perfil cromatográfico correspondem a extensão de histidinas seguido pelo fracionamento de outros peptídeos menores e contaminantes com baixa

concentração que não foram detectados na separação eletroforética (colunas 6 e 7, respectivamente).

A fração purificada (pico A, Figura 52- pico A) foi concentrada por ultrafiltração em membrana Millipore, cuja alíquota final resultou em 1,1ml de solução proteica a 13,23 mg/mL que foi diluída a 0,23mg/mL em tampão fosfato de potássio pH 8,0 e conduzida à espectroscopia de dicroísmo circular. Além disso, uma alíquota de 1,5 mg total de NgSPS2.CTD_(c.t.) foi aplicada em SDS-PAGE 10%, seguindo o padrão da Figura 47, para a produção de anticorpo.

4.2.3.2 Eletroforese em gel não desnaturante - Gel nativo

A investigação do estado oligomérico de NgSPS2.CTD_(c.t.) foi analisada também por eletroforese em condições não desnaturantes. Uma amostra de 2,6 mg/mL de NgSPS2.CTD clivada com trombina foi dialisada contra um tampão sem sal (20 mM Tris pH 8,0) e 4µl da proteína foi aplicado em gel de gradiente 8-25 % (*PhastGel-GE*) em conjunto com o padrão de massa molecular resultando na Figura 53-1. A distância de migração entre as proteínas do marcador padrão M (kDa) foi utilizada para a construção do gráfico em função do *log* de cada massa molecular (Figura 53-2). O ajuste linear dos dados forneceu a equação da reta utilizada na determinação da massa experimental de NgSPS2.CTD_(c.t.).

Figura 53 - Eletroforese em gel nativo para avaliação do estado oligomérico de NgSPS2.CTD_(c.t.). 1 - Coluna 1 contém a amostra NgSPS2.CTD_(c.t.) a 2,6 mg/mL encontrada nos estados dimérico (A) e tetramérico (B) e o marcador molecular de alta massa M (kDa) na coluna seguinte. 2 - curva de calibração da proteína para obtenção da equação da reta e cálculo da massa experimental.

Fonte: Elaborada pela autora.

O resultado da Figura 53 revelou que *NgSPS2.CTD*, após a clivagem com trombina, apresenta-se em solução com predominância dimérica devido a massa experimental calculada de (88 ± 7) kDa em comparação com a massa teórica de 94,4 kDa. O perfil eletroforético da amostra indicou a coexistência de mais de um estado oligomérico em solução, porém em menor concentração (banda B – canaleta 1 do gel nativo). A massa calculada, de acordo com a distância de migração desta banda, forneceu o valor de 209 ± 12 kDa correspondendo ao tetrâmero de *NgSPS2.CTD*(c.t.), próximo da massa teórica para o tetrâmero (188,8 kDa).

Estes resultados confirmam o estado oligomérico observado com as cromatografias de exclusão molecular devido a predominância de dímeros em solução. A presença de tetrâmeros pode ser devido à dificuldade em separar as duas frações pelos métodos cromatográficos e sugere possível equilíbrio entre as formas dimérica e tetramérica em solução, esta última em menor quantidade.

4.2.3.3 Espectroscopia de dicroísmo circular - CD

A análise de *NgSPS2.CTD* e *NgSPS2.FL* por espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada para investigação da estabilidade estrutural a partir do padrão de enovelamento secundário obtido.

Para *NgSPS2.FL*, a alíquota obtida após cromatografia de afinidade foi dialisada em tampão sem sal (20 mM fosfato de potássio pH 8,0) e 0,2 mg/ml foi utilizado para as medidas de CD com o objetivo de analisar possível instabilidade conformacional devido ao tratamento brusco da lise alcalina.

O produto resultante da purificação em exclusão molecular para *NgSPS2.CTD*_(c.t.) a 13,3 mg/mL foi diluído no tampão sem sal resultando na concentração de 0,2 mg/mL. Esta amostra foi analisada por CD.

Os espectros de *NgSPS2.CTD*_(c.t.) e *NgSPS2.FL* foram plotados na mesma figura e o resultado pode ser visualizado no gráfico 6.

Gráfico 6 - Comparação entre o espectro de dicroísmo circular para as proteínas recombinantes NgSPS2.FL e NgSPS2.CTD(c.t.) de *N. gruberi*. Gráfico obtido através do programa Origin 8.6 (ORIGINLab).

Fonte: Elaborado pela autora.

As medidas foram capturadas em uma faixa de comprimento de onda de 205 a 260nm. Devido a contribuição negativa do tampão na absorção da luz houve interferência e saturação do sinal em menores comprimentos de onda. Portanto, para analisar os espectros sem incluir este efeito, a faixa teve que ser reduzida para 205 – 260nm, como evidente no gráfico 6.

O espectro obtido para NgSPS2.CTD(c.t.), representado pela linha preta (gráfico 6) é caracterizado por dois sinais negativos com ápices próximos a 208 e 222nm, respectivamente, cujo perfil corresponde a espectros típicos de proteínas de hélices α .¹⁰¹

Estruturas de selenofosfato sintetase homólogas e análises de dicroísmo circular^{62,64} revelaram conformação mista entre hélices α e folhas β para o enovelamento secundário dos domínios N- e C-terminal e o perfil de CD para uma Seld de *E.coli* obtido em pesquisa anterior⁶⁴ está indica no gráfico 7.

Gráfico 7 – Espectros sobrepostos de SPSs mutantes de *E.coli*. WT corresponde à proteína selvagem adicionada apenas a extensão de histidinas e os demais códigos referem-se às mutações pontuais baseadas na substituição de aminoácidos.

Fonte: NOINAJ.⁶⁴

Os resultados referentes ao gráfico 7 indicaram que nem a extensão de histidinas e nem os aminoácidos mutados tiveram efeito significativo no enovelamento da estrutura secundária da enzima, conforme proposto pelos autores⁶⁴ e, em comparação aos resultados experimentais do gráfico 6, permitem sugerir que o espectro de CD para NgSPS2.CTD(c.t.) condiz ao perfil de uma SPS homóloga com secundária mista⁶⁴ (gráfico 7). Entretanto, a estimativa da porcentagem de cada estrutura secundária a partir da deconvolução do espectro experimental de NgSPS2.CTD(c.t.) serão realizados futuramente, devido a necessidade em reavaliar a composição do tampão para obter as informações na faixa de comprimento de onda entre 190-205nm.

Os dois espectros obtidos (gráfico 6) foram observados comparativamente e permitiram extrair uma análise qualitativa em relação ao estado de desnaturação de uma proteína em relação à outra. Ou seja, enquanto NgSPS2.CTD revelou espectro com perfil de estrutura secundária mista, o espectro de CD obtido para NgSPS2.FL indicou um padrão típico de proteínas que não possuem estrutura secundária enovelada, conforme descrições da literatura.⁹⁹ Estudos envolvendo a variação no aumento da temperatura monitorados por espectroscopia de dicroísmo circular evidenciaram uma mudança no espectro de CD de proteínas cuja estrutura foi desenovelada após a exposição às altas temperatura¹⁰⁴ cujo espectro assemelha-se ao de NgSPS2.FL.

Deste modo sugerimos que o efeito da desnaturação térmica é similar ao efeito do aumento do pH ao qual NgSPS2.FL foi submetida devido ao desenovelamento na estrutura

secundária evidente no espectro do gráfico 6. Acredita-se portanto que a solubilização alcalina expôs a proteína a condições extremas que agrediram a estabilidade química dos resíduos levando à desnaturação. Estes resultados confirmam a importância em otimizar o método de solubilização e justificam os esforços descritos no item 3.2.4 para descoberta de detergentes no tampão de lise que conduzam a solubilidade da proteína sem agredir a estrutura química.

4.2.3.4 Ensaio de proteólise limitada com NgSPS2.CTD_(c.t.)

Os ensaios de proteólise limitada foram conduzidos com o objetivo de otimizar a cristalização de NgSPS2.CTD investigando as condições de maior estabilidade da proteína na ausência de resíduos desenovelados no início do segmento flexível da região N-terminal de SPSs, como discutido no item 4.2.1.

Foram utilizadas cinco enzimas proteolíticas conforme descrito na tabela 7, item 3.2.9. Uma amostra de NgSPS2.CTD_(c.t.) a 5 mg/ml foi incubada com cada uma das enzimas proteolíticas nas concentrações de 100µg/ml, 250µg. /ml e 500µg/ml a 20°C durante 35 minutos e alíquotas foram coletadas a cada 5 minutos para análise em SDS-PAGE 15%.

Dentre as cinco enzimas analisadas a enzima que forneceu melhor conjunto de produtos estáveis após a clivagem foi a tripsina. A interpretação dos resultados obtidos no perfil eletroforético foi comparada com a análise *in silico* dos sítios de reconhecimento de tripsina pelo programa PeptideCutter, cujas sequências primárias foram utilizadas para o cálculo da massa molecular teórica através do ProtParam (ExpaSy).

A Figura 54 resume todos os possíveis sítios de clivagem detectados pelo PeptidCutter ao analisar a sequência primária de NgSPS2.CTD_(c.t.).

Figura 54 - Análise dos sítios de reconhecimento de Tripsina a partir da sequência primária de NgSPS2.CTD_(c.t.). A - Identificação dos 40 possíveis sítios de clivagem indicados pelos resíduos arginina (R) ou lisina (K) corados em vermelho. B - representação das duas regiões com estrutura identidade sequencial à AIRS_N-terminal em azul escuro e AIRS_C-terminal em azul claro. A região intermediária representada pelo segmento verde corresponde à sequência de aminoácidos entre os dois domínios.

Fonte: Elaborada pela autora.

Inicialmente, as amostras obtidas com a reação de clivagem de NgSPS2.CTD_(c.t.) na presença de 100 µg/ml tripsina foram aplicadas em gel poliacrilamida 15% e o resultado está apresentado na Figura 55, em conjunto com a interpretação *in silico* dos sítios de clivagem e predição da massa teórica correspondente.

Figura 55 - NgSPS2.CTD_(c.t.) clivada com 100µg/ml de tripsina. A - Gel poliacrilamida 15% com a análise do produto de clivagem ao longo do tempo (0-35 minutos). A primeira coluna contém o marcador de massa molecular e as colunas seguintes referem-se as alíquotas retiradas a cada 5 minutos de reação. B - sequência primária de NgSPS2.CTD_(c.t.) evidenciando os 13 primeiros sítios de clivagem. C - Esquema indicando a região de clivagem no início do N-terminal representada pelo tracejado vermelho. D - Relação entre a massa molecular teórica predita para a sequência primária restante após a clivagem em cada um dos sítios preditos, valores calculados pelo ProtParam (Expasy).

continua

continuação

GMKETAAAKFERQHMDSPDLGTDDDDKAMAGLKSKGAAAPSMATSGGGSGSSSCGPGGGATGVASSCSSSSISSSGVCFSKKVSLN
VNADNVKLTQLASGLGCGCKINSRLDSILQKLPKQPENNSVLVGNSTCDDAAVYKINDHVAIVSTIDFFAPIVDNPNYDFGAACANA
LSDVYAMGGKPKTALSVAFPSTRLPIELQEILRGSIDKANEAGVAIVGGHSIDDEEPKFGMSVNGIHPDKIFRNVGCEEGDLLFLT
KRIGTGVITSAMKLGPNVPESETAQSAINSMTLNRDTSYVLREMKSVSSCTDVTGFGLLGHLKEIMKGSREICEENKDLVAQLNAK
QIPLDSSCLSMRIVIPGGTKTNLENVQQFVEFASTLSKEEQULADAQTSGGLLFTISPDEEEKLVNSFKEKNLNLWKIGEIVKKPNS
VLIQVLDQ

B

C

Sítio de clivagem	MM estimada (kDa)
10	37,1
11	36,6
12	35,7
13	35,4

D

Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil eletroforético para clivagem de NgSPS2.CTD_(c.t.) com 100 µg/mL Tripsina gerou um produto de massa molecular próximo à 37 kDa conforme evidenciado no gel poliacrilamida 15% (Figura 55-A). Segundo análises no PeptideCutter, em conjunto com a massa molecular predita no ProtParam, os possíveis sítios de clivagem que fornecem uma massa próxima à 37 kDa incluem do 10º ao 13º sítio o que corresponde aos valores teóricos de 35,4 a 37,2 kDa (Figura 55-D).

Como mostrado na figura 55 – C, os sítios alvo da clivagem com 100 µg/ml estão nas regiões expostas do N-terminal da proteína ou seja, nos peptídeos à frente de AIRS_NTD o que permite a obtenção de um fragmento estável com os dois domínios AIRS_NTD e AIRS_CTD mantidos fusionados. A verificação no gel revelou também que, com o aumento do tempo de incubação, a reação não aumenta a eficiência e o padrão de clivagem é mantido. Portanto o tempo escolhido para deixar a reação foi de 5 minutos.

O resultado obtido para a segunda concentração avaliada, 250 µg/ml tripsina, está resumido na Figura 56.

Figura 56 - NgSPS2.CTD_(c.t.) clivada com 250µg/ml tripsina. A - Gel poliacrilamida 15% com a análise do produto de clivagem ao longo do tempo (0-35 minutos). A primeira coluna contém o marcador de massa molecular e as colunas seguintes referem-se as alíquotas retiradas a cada 5 minutos de reação. B - sequência primária de NgSPS2.CTD_(c.t.) evidenciando os quatro sítios de clivagem na ponta N-terminal e os 3 sítios de clivagem encontrados na região flexível entre os dois domínios. C - Esquema indicando as duas possíveis regiões de clivagem acessadas a partir do aumento na concentração da protease. D - Relação entre a massa molecular teórica predita para a sequência primária restante após a clivagem do grupo I (proteína clivadas apenas no N-terminal) e do grupo II (proteínas clivadas na região de fusão entre os dois domínios) contendo a massa molecular calculada pelo ProtParam (Expasy)

Fonte: Elaborada pela autora.

O padrão observado no SDS-PAGE 15% revelou duas regiões principais com bandas de intensidades semelhantes cujos sítios de clivagem para tripsina estão localizados ou no início do N-terminal, mesmo padrão da Figura 55, ou na região flexível entre N- e C-terminal (Figura 56-C). A sequência peptídica que compreende estas duas regiões possui três sítios de

reconhecimento de tripsina (Figura 56-B) e as massas moleculares resultantes calculadas pelo Protparam resultam em peptídeos entre 20 e 23 kDa.

A terceira reação de clivagem empregando 500µg/ml tripsina e está resumida na figura 57.

Figura 57 - *NgSPS2.CTD(c.t.)* clivada com 500µg/ml tripsina. A - Gel poliacrilamida 15% com a análise do produto de clivagem ao longo do tempo (0-35 minutos). A primeira coluna contém o marcador de massa molecular e as colunas seguintes referem-se às alíquotas retiradas a cada 5 minutos de reação. B - sequência primária de *NgSPS2.CTD(c.t.)* evidenciando os 3 sítios de clivagem acessados por tripsina. C - Esquema indicando região clivada a partir do aumento na concentração da protease. D - Relação entre a massa molecular teórica predita para a sequência primária restante após a clivagem da interface entre os dois domínios.

GMKETA^{AAK}FERQHMDSPDLGTDDDDKAMAGLKS^{KA}APSMATSGGGSGSSSCGPGGGATGVASSCSSSISSSGVCF^{SK}KVSLN
VNADNVKLTQLASGLGCGCKINSRL^{LD}SILQKLPKQPENNSVLVGNST^{CD}DAAVYKINDHVAIVSTIDFFAPIVDNPYDFGAIACANA
LSDVYAMGGKPKQTALS^VVAFPSRTLPIEILQEI^{LR}SGIDKANEAGVAIVGGHS^{ID}DEEP^KFGMSVNGIHPDK^IFR^{NV}GCEEGDLLFLT
KRIGTG^VITSAMKLG^NVPYESETAQSA^{IN}SMKTLNRDTSYV^LREMKSVSSCTDVTG^FGLLGH^LKEIMKGSREICEENKDLVAQLNAK
QIPL^{LD}SSCLSLMRIVPGG^TKTNL^ENVQ^QFVEFASTLSKEEQ^LILADAQTSGGL^LFTISPDEEEK^LVNSFKEKNLNLWKIG^EIVKKPNS
VLIQVLDQ

Sítio de clivagem	MM estimada (kDa) Ctd	MM estimada (kDa) Ntd
18	23,5	20,4
19	22,1	21,8
20	21,7	22,2

O padrão de bandas revelado na figura 57 mostra bandas mais intensas entre 17 e 25 kDa. Detalhe observado pela separação eletroforética evidenciou que o aumento do período de incubação levou ao aumento do produto clivado na sequência entre os domínios N- e C-terminal.

A análise comparada do teste de proteólise baseado nas três concentrações de tripsina a partir das Figuras 55 a 57 revelou que a concentração de 100 µg/ml é a mais efetiva para produção de peptídeos estáveis. Portanto, foram determinados a concentração de uso da protease e o tempo de incubação da reação (5 minutos). Assim este protocolo passou a ser empregado para análises biofísicas e estruturais feitas por cromatografia de exclusão molecular (3.2.10.1) e ensaios de cristalização (3.2.10.4), respectivamente.

Estes testes, envolvendo a clivagem de regiões instáveis, têm se revelado promissores como otimização da cristalização conforme resultados obtidos em pesquisas com selenofosfato sintetase de tripanosomatídeos que levaram a obtenção de cristais difratados em alta resolução após a aplicação da proteólise *in situ*.⁹⁵

4.2.3.5 Cromatografia de exclusão com NgSPS2.CTD_(p.l.)

A investigação do estado oligomérico de NgSPS2.CTD_(p.l.) através da cromatografia de exclusão molecular analítica foi realizada a partir da coleta de NgSPS2.CTD(c.t.) a 10 mg/mL que foi conduzida a proteólise limitada com 100 µg/ml tripsina durante 5 minutos a 20° C. Após adição de 1 mM PMSF o produto clivado foi concentrado a 8,9 mg/mL e 500 µl foi aplicado na coluna Superdex 200 HR 10/300 (GE).

O resultado da purificação e análise das frações obtidas através de separação eletroforética pode ser verificado na Figura 58.

Figura 58 - Resultado da purificação de *NgSPS2.CTD_(p.l.)*. As amostras eluídas durante a purificação foram avaliadas por eletroforese desnaturante. A região A do cromatograma corresponde às canaletas 10-13 no SDS-PAGE 15%. A região B corresponde as amostras numeradas de 14 a 16 e a faixa C é equivalente as canaletas 17 a 23. As colunas identificadas como M(kDa) no início do primeiro e do segundo gel referem-se ao padrão de massa molecular (97,4; 66,2; 45; 31; 21,5 e 15 kDa).

Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil cromatográfico revelou uma baixa concentração de amostra durante a purificação justificado pela faixa de absorbância atingida (Figura 58-linha tracejada). O produto estável obtido pela clivagem com tripsina foi eluído no volume correspondente a região B do cromatograma e a alíquota equivalente foi analisada em SDS-PAGE 15%, confirmado pela banda única na região esperada próxima a 37 kDa para as canaletas 14, 15 e 16.

O volume de eluição para o pico de maior absorbância (15,33ml) corresponde a massa de 54 ± 6 kDa, calculada através da curva de calibração da coluna, e a absorbância detectada em 11,95 ml resultou em $152,9 \pm 15$ kDa (Figura 58). Considerando a massa teórica de 37 kDa para *NgSPS2.CTD(p.l.)* e a margem de erro embutida no cálculo da massa experimental, os resultados anteriores permitem sugerir a presença de dímeros e tetrâmeros em solução cujos valores teóricos equivalem a 74 kDa e 148 kDa, respectivamente.

Os dois últimos picos apresentados no cromatograma correspondem aos peptídeos de menor massa obtidos após a clivagem com tripsina, confirmados pelas bandas próximas à 15 kDa para as colunas 19 a 23 do SDS-PAGE 15% (Figura 58).

O eluato obtido após cromatografia de exclusão molecular foi concentrado e o produto resultante foi de 1,36 mg/mL em 500 µl final o que demonstrou baixo rendimento na purificação e, portanto requer a otimização dos protocolos.

Além disso, avaliações precisas para a confirmação do ponto de clivagem poderão ser conduzidas a partir desta etapa, dentre elas sequenciamento de Edman investigando o ponto de clivagem na porção N-terminal ou espectroscopia de massas com o produto purificado na exclusão molecular após clivagem com tripsina.

4.2.3.6 Cristalização dos produtos *NgSPS2.CTD_(n.t.)*, *NgSPS2.CTD_(c.t.)* e *NgSPS2.CTD_(p.l.)*

A avaliação estrutural de *NgSPS2.CTD* a partir de monocristais foi iniciada com o uso de Kits comerciais contendo 96 condições de solução precipitante, conforme descrito na seção metodológica (3.2.10.4). O resultado desta triagem automatizada revelou três categorias principais quanto ao aspecto da gota de cristalização. A figura 59 resume o que foi classificado como gota limpa (1), precipitado amorfo em fase inicial, intermediária e completamente formado (2.1, 2.2 e 2.3), além das condições com possível início de nucleação, precipitados cristalinos ou microcristais (3).

Figura 59 - Fotos das gotas utilizadas como modelo para a categorização da triagem inicial de cristalização. As imagens indicam, respectivamente, o padrão de uma gota limpa (2), precipitados amorfos (2.1 a 2.3) e microcristais, precipitados cristalinos ou início de nucleação (3).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os três Kits comerciais testados tiveram suas condições de cristalização acompanhadas a partir da categorização das gotas utilizando a Figura 59 como guia, e o resultado foi resumido na tabela 14.

Tabela 14 - Relação entre a porcentagem de gotas limpas (1), precipitados em fase inicial (2.1), fase intermediária (2.2), fase final (2.3) e gotas com possível nucleação (3*) para cada Kit testado. A, B e C indicam, respectivamente, NgSPS2.CTD_(n.t.), NgSPS2.CTD_(p.t.) e NgSPS2.CTD_(p.l.).

Tipo de Gota		<i>Crystal Screen HT</i>			<i>Salt RX</i>			<i>PEGs Suite</i>		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C
1		35,36	44,72	71,76**	63,44	64,48	84,24**	39,52	35,36	69,68**
2	2.1	17,68	22,88	11,44	12,48	15,6	6,24	30,16	10,4	14,56
	2.2	30,16	19,76	4,16	15,6	10,4	5,2	23,92	35,36	9,36
	2.3	13,52	7,28	8,32	6,24	8,32	2,08	2,08	13,52	4,16
3*		3,12	5,2	4,16	2,08	1,04	2,08	4,16	5,2	2,08

Fonte: Elaborada pela autora.

Ao acompanhar as condições de cristalização que geraram as gotas do terceiro grupo (3*), após a observação periódica, não foi detectada a formação de cristais para nenhum dos três Kits e, dentre os motivos para a dificuldade em cristalizar a proteína é possível que o N-terminal flexível em NgSPS2.CTD_(n.t.), NgSPS2.CTD_(p.t.) tenha interferido em sua estabilidade.

Com isso a amostra NgSPS2.CTD_(p.l.) seria mais favorável à cristalização porém também não resultou na formação de cristais após proteólise *in situ*. Neste caso, os motivos para o resultado negativo podem ter sido: subprodutos da clivagem com tripsina, após a reação de proteólise, podem ter interferido negativamente na formação de cristais e, portanto, será necessária uma etapa de purificação da amostra em cromatografia de exclusão molecular antes de conduzi-la aos ensaios de cristalização. A segunda hipótese é que a concentração de amostra foi muito baixa após a clivagem, por isso foi insuficiente ao início do processo de nucleação. Esta segunda discussão é condizente com a porcentagem de gotas limpas encontradas na triagem inicial de cristalização para NgSPS2.CTD_(p.l.) (amostra C, tabela19). Os valores marcados com ** revelam as maiores porcentagens para gotas do tipo 1 em comparativo com as amostras A e B.

Os resultados obtidos após a cromatografia de exclusão molecular com NgSPS2.CTD_(p.l.) revelaram amostra pura na fração eluída o que reforça o interesse em utilizar

este subproduto na otimização da cristalização. Em alternativa, as amostras *NgSPS2.Ctd*_(n.t.) e *Ng.SPS2.CTD*_(c.t.) poderão ser reavaliadas novamente incluindo às condições de cristalização a adição de metais (Co^{2+} ou Mg^{2+}) que tenham funcionalidade *in vivo*, conforme revelado em estudos prévios de selenofosfato sintetase homólogas resultando na obtenção dos melhores cristais após adição dos ligantes.^{62,64}

5 CONCLUSÕES

A trajetória adotada durante a pesquisa envolveu duas frentes de estudo sendo a experimentação em cultura de células, baseada no cultivo e manipulação de *N. gruberi*, e a caracterização biofísica e bioquímica de selenofosfato sintetase recombinante. As conclusões obtidas revelam o crescimento preferencial das células de *N. gruberi* cultivadas com ATCC 1034 e a não reposição do meio de cultura provocou a coexistência das três formas amebóide, cística e flagelar ao longo da curva de crescimento.

O melhor método de encistamento consistiu na permanência da cultura, durante nove dias, em ATCC 1034 fornecendo cerca de 98% das células em suspensão na forma encistada. O método mais efetivo para a diferenciação dos trofozoítos em flagelados envolveu substituição do meio de cultivo por água destilada e adição de 20 mM NaCl resultando no aparecimento de flagelos em 90% das células em suspensão.

Os ensaios imunoenzimáticos revelaram o reconhecimento entre ambos os anticorpos, *antiNgSPS2.CTD* e *antiNgSPS2.FL*, com proteínas de massa molecular inferior ao esperado para *NgSPS2*, 80,4 kDa. Com o aumento da resolução eletroforética tornou-se clara a presença de duas bandas proteicas na altura próxima a 50 kDa, para as três formas de *N. gruberi*, quando incubadas com *antiNgSPS2.FL* sugerindo que após o processamento da proteína os dois domínios N e C-terminal estão separados.

Os experimentos de suplementação com selenito de sódio e a indução de estresse oxidativo evidenciaram dois principais efeitos para o selênio de acordo com sua concentração no interior celular. Em concentrações elevadas (15 a 100 μ M selenito de sódio) foi detectado aumento no número de cistos, confirmando o efeito pró oxidativo e potencialmente tóxico decorrente do acúmulo de selênio. Em contraponto, as culturas de células estressadas com peróxido de hidrogênio e que foram enriquecidas com selenito de sódio em baixa concentração (10 μ M) tornaram-se menos sensíveis aos efeitos do estresse oxidativo. Este efeito pode estar associado ao aumento na síntese de selenoproteínas devido à super expressão de *NgSPS2*.

Quanto à investigação bioquímica e funcional da proteína recombinante, para *NgSPS2.FL* a solubilização alcalina demonstrou-se efetiva devido à obtenção da proteína na fração solúvel o que permitiu a produção do anticorpo policlonal, porém os resultados do experimento de CD revelaram a desnaturação química proveniente deste aumento de pH. Por outro lado, o teste de solubilização com adição de detergentes no tampão de lise resultou em

três detergentes favoráveis à solubilização da proteína: 1% Sarcosil, 20mM CHAPS e 1% Triton X-100.

Para *NgSPS2.CTD*, os métodos utilizados para analisar sua conformação oligomérica, cromatografia de exclusão molecular e eletroforese em gel não desnaturante, resultaram na detecção da proteína com predominância da forma dimérica em solução, assim como esperado para proteínas com atividade ATPasica agrupadas na família das PurM. O estudo da sequência primária por ferramentas de bioinformática resultou em regiões de conservação entre o domínio C-terminal de *NgSPS2* e selenofosfato sintetase homólogas incluindo os resíduos de aminoácidos responsáveis pela ligação de ATP, interface de dimerização e catálise enzimática.

O espectro de CD revelou apenas que a proteína obedece a um perfil de enovelamento misto ($\alpha+\beta$) característico de selenofosfato sintetase homólogas porém o experimento será reavaliado.

Os ensaios de cristalização não resultaram em cristais, entretanto os testes de proteólise limitada revelaram tripsina como a melhor enzima para obtenção de um produto estável de *NgSPS2.CTD*(c.t.) que poderá ser utilizado em novos testes de cristalização. A proteólise *in situ* revelou a necessidade de realizar um passo adicional de purificação em exclusão molecular seguida dos ensaios de cristalização, além do aumento na concentração de amostra permitindo a nucleação proteica.

6 PERSPECTIVAS

Dentre os resultados que poderão ser retomados futuramente, a presença das duas bandas de proteína próximas à 50kDa sugerindo a clivagem dos domínios N e C terminais poderá ser confirmada por imunoprecipitação dos anticorpos seguida da análise da fração eluída em espectrometria de massas. Em paralelo poderá ser feita a quantificação dos mRNAs em cada fase (cistos, ameboides e flagelares) através da técnica de qPCR.

Quanto aos experimentos *in vitro*, os testes de solubilidade para NgSPS2.FL poderão ser reavaliados para selecionar, dentre os três detergentes previamente escolhidos, um deles que conduza ao maior rendimento proteico após as etapas de purificação sem alterar a estabilidade da proteína.

Os experimentos de dicroísmo celular, compondo a caracterização biofísica conduzida com NgSPS2.CTD, será retomado otimizando-se o tampão da proteína a fim de obter as informações de comprimentos de onda próximos a 195 nm que permitam a desconvolução do espectro determinando as proporções relativas de cada tipo de estrutura secundária.

Por fim, a caracterização estrutural ficará como perspectiva para a determinação exata do ponto de clivagem com tripsina cuja avaliação poderá ser feita por sequenciamento de Edman ou espectrometria de massas após a purificação da amostra eluída.

REFERÊNCIAS

- 1 DE JONCKHEERE, J. F. A century of research on the amoeboflagellate Genus *Naegleria*. **Acta Protozoologica**, v.41, n.4, p. 309–342, 2002.
- 2 CARTER, R. F. Primary amoebic meningo-encephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.96, n.1, p.1–25, 1968.
- 3 FRITZ-LAYLIN, L. K. et al. The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. **Cell**, v.140, n. 5, p.631–642, 2010.
- 4 DE JONCKHEERE, J.F. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. **Infection, Genetics and Evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.11, n.7, p.1520–1528, 2011.
- 5 MARCIANO-CABRAL, F. Biology of *Naegleria* spp. **Macrobiology and Molecular Biology Reviews**, v.52, n.1, p.114–133, 1988.
- 6 RODRÍGUEZ-EZPELETA, N. et al. Toward resolving the eukaryotic tree: the phylogenetic positions of jakobids and cercozoans. **Current Biology**, v.17, n.16, p.1420–1425, 2007.
- 7 FULTON, C. Amebo-flagellates as research partners: the laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. **Methods in Cell Biology**, v.4, p. 341–476, 1970. doi: 10.1016/S0091-679X(08)61759-8.
- 8 OPPERDOES, F. R.; DE JONCKHEERE, J. F.; TIELENS, A. G. M. *Naegleria gruberi* metabolism. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 9, p. 915–924, 2011.
- 9 MARTINEZ, A. J.; VISVESVARA, G. S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. **Brain Pathology**, v. 7, n. 1, p. 583–598, 1997.
- 10 LAI, E.Y. A. Flagellar calmodulin gene of *Naegleria*, coexpressed during differentiation with flagellar tubulin genes, shares DNA, RNA, and encoded protein sequence elements. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, n.11, p.5839–5848, 1995.
- 11 TODD, S. R.; KITCHING, J. A. Effects of high hydrostatic pressure on morphogenesis in *Naegleria gruberi* (Schardinger). **Journal of Protozoology**, v. 20, n. 3, p. 421–424, 1973.
- 12 DE JONCKHEERE, J. F. The isolation of *Naegleria italica* from Peru indicates that this potentially pathogenic species occurs worldwide. **Parasitology International**, v. 54, n. 3, p. 173–175, 2005.
- 13 DYKOVÁ, I. et al. Identity of *Naegleria* strains isolated from organs of freshwater fishes. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 46, n. 2, p. 115–121, 2001.
- 14 JOHN, D. T. Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. **Annual Review of Microbiology**, v. 36, p. 101–123, 1982.
- 15 SHAKOOR, S. et al Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*, Karachi, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 258–261, 2011.
- 16 YODER, J. S. et al. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 7, p. 968–975, 2010.
- 17 DEPARTMENT of state Health Services. Disponível em:
<https://www.dshs.state.tx.us/idcu/disease/primary_amebic_meningoencephalitis/faqs/>. Acesso em: 14 abr. 2015.

18 CENTERS for Disease control and prevention. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/parasites/Naegleria/general.html>>. Acesso em: 14 abr. 2015.

19 BAIG, A. M.; KHAN, N. A. Tackling infection owing to brain-eating amoeba. **Acta Tropica**, v. 142, p.86–88, 2015. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.11.004.

20 BAIG, A. M.; KHAN, N.A. Novel chemotherapeutic strategies in the management of primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 20, n. 3, p. 289–290, 2014.

21 BAGINSKI, M.; CZUB, J. Amphotericin B and its new derivatives – mode of action. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 5, p. 459–469, 2009.

22 MOREIRA, R. A. et al. Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *Leishmania amazonensis* membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3021–3028, 2014.

23 COGO, P.E. et al. Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1835–1837, 2004.

24 PAPP, L. V. et al. From Selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775–806, 2007.

25 U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **ATSDR (2003) Toxicological profile for selenium**. Atlanta: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2003

26 STOCK, T.; ROTHER, M. Selenoproteins in Archaea and Gram-positive bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1520–1532, 2009.

27 SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 12, p. 3292–3293, 1957.

28 MÉNEZ, M.; BALOGH, K. Prooxidant mechanisms of selenium toxicity – a review. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 53, n. 1, p. 15–18, 2009.

29 HUANG, Z.; ROSE, A. H.; HOFFMANN, P. R. The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 16, n. 7, p. 705–743, 2012.

30 CLARK, L. C. Effects of Selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. **JAMA**, v. 276, n. 24, p. 1957, 1996.

31 BECKETT, G. J.; ARTHUR, J. R. Selenium and endocrine systems. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 3, p. 455–465, 2005.

32 HOFFMAN, J. L. Selenite toxicity, depletion of liver S-adenosylmethionine, and inactivation of methionine adenosyltransferase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 179, n. 1, p. 136–140, 1977.

33 SILVA, C. R. **Avaliação do estado nutricional relativo ao selênio de pré-escolares institucionalizados**. 2006. p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

34 MORENO-REYES, R. et al. Kashin-Beck osteoarthropathy in rural Tibet in relation to selenium and iodine status. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n.16, p. 1112–1120, 1998.

35 URSINI, F. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, n. 5432, p. 1393–1396, 1999.

- 36 JOHANSSON, L.; GAFVELIN, G.; ARNÉR, E. S. J. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1726, n. 1, p. 1–13, 2005.
- 37 ALLMANG, C.; WURTH, L.; KROL, A. The selenium to selenoprotein pathway in eukaryotes: more molecular partners than anticipated. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1415–1423, 2009.
- 38 DEBNATH, A. et al. Corifugin, a new drug lead against Naegleria, identified from a high-throughput screen. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 5450–5457, 2012.
- 39 STOTT, R. A. W. Enhanced chemiluminescence immunoassay. In: WALKER, J. M. (Ed.). The protein protocols handbook. 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2002. P.
- 40 ARBOGAST, S.; FERREIRO, A. Selenoproteins and protection against oxidative stress: selenoprotein N as a novel player at the crossroads of redox signaling and calcium homeostasis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 12, n. 7, p. 893–904, 2010.
- 41 STEWART, M. S. et al. Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 42–48, 1999.
- 42 HONDAL, R. J.; MARINO, S. M.; GLADYSHEV, V. N. Selenocysteine in thiol/disulfide-like exchange reactions. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 13, p. 1675–1689, 2013.
- 43 ARNÉR, E. S. J. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1296–1303, 2010.
- 44 BOCK, A. et al. Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 463–467, 1991.
- 45 LOBANOV, A. V.; HATFIELD, D. L.; GLADYSHEV, V. N. Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1424–1428, 2009.
- 46 CASTELLANO, S. On the unique function of selenocysteine - insights from the evolution of selenoproteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1463–1470, 2009.
- 47 ZHANG, Y.; FOMENKO, D. E.; GLADYSHEV, V. N. The microbial selenoproteome of the Sargasso Sea. **Genome Biology**, v. 6, n. 4, p. R37, 2005.
- 48 KRYUKOV, G. V.; GLADYSHEV, V. N. The prokaryotic selenoproteome. **EMBO Reports**, v. 5, n. 5, p. 538–543, 2004.
- 49 WILTING, R. et al Selenoprotein synthesis in archaea: identification of an mRNA element of *Methanococcus jannaschii* probably directing selenocysteine insertion. **Journal of Molecular Biology**, v. 266, n. 4, p. 637–641, 1997.
- 50 GRAENTZDOERFFER, A. et al Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. **Archives of Microbiology**, v. 179, n. 2, p. 116–130, 2003.
- 51 MARIOTTI, M. et al. **Evolution of selenophosphate synthetases**: emergence and relocation of function through independent duplications and recurrent subfunctionalization. doi: 10.1101/014928. Disponível em: <<http://biorxiv.org/content/biorxiv/early/2015/02/05/014928.full.pdf>>Feb 2015>. Acesso em: 20 mar. 2015.
- 52 GUIMARÃES, M. J. et al. Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: Is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 26, p. 15086–15091, 1996.

- 53 MAIORINO, F. M. et al Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 252, p. 38–48, 1995.
- 54 LUKASHENKO, N. P. Expanding genetic code: amino acids 21 and 22, selenocysteine and pyrrolysine. **Russian Journal of Genetics**, v. 46, n. 8, p. 899–916, 2010.
- 55 ALLMANG, C.; KROL, A. Selenoprotein synthesis: UGA does not end the story. **Biochimie**, v. 88, n. 11, p. 1561–1571, 2006.
- 56 DA SILVA, M. T .A. et al. Selenocysteine biosynthesis and insertion machinery in *Naegleria gruberi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 188, n. 2, p. 87–90, 2013.
- 57 XU, X.-M. et al. Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. **Biochemical Journal**, v. 404, n. 1, p. 115–120, 2007.
- 58 ROTHER, M.; KRZYCKI, J. A. Selenocysteine, pyrrolysine, and the unique energy metabolism of methanogenic archaea. **Archaea**, v. 2010, p. 453642, 2010.
- 59- SECISearch. Disponível em: <<http://genome.unl.edu/SECISearch.html>>. Acesso em: 02/09/2014
- 60 MATSUMOTO, E. et al. Structure of an N-terminally truncated selenophosphate synthetase from *Aquifex aeolicus*. **Acta Crystallographica Section F: structural biology and crystallization communications**, v. 64, Pt 6, p. 453–458, 2008.
- 61 LI, C. et al. X-ray crystal structure of aminoimidazole ribonucleotide synthetase (PurM), from the *Escherichia coli* purine biosynthetic pathway at 2.5 Å resolution. **Structure**, v. 7, n. 9, p. 1155–1166, 1999.
- 62 ITOH, Y. et al. Structure of selenophosphate synthetase essential for selenium incorporation into proteins and RNAs. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 5, p. 1456–1469, 2009.
- 63 ZHANG, Y.; MORAR, M.; EALICK, S.E. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 65, n. 23, p. 3699–3724, 2008.
- 64 NOINAJ, N. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of *Escherichia coli* selenophosphate synthetase. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 2, p. 499–508, 2012.
- 65 SCHORL, C.; SEDIVY, J. M. Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells. **Methods**, v. 41, n. 2, p.143–150, 2007.
- 66 HOOK, L. A. Stem cell technology for drug discovery and development. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 7-8, p. 336–342, 2012.
- 67 PASCHOS, N. K. et al Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 5, p. 488–503, 2015.
- 68 ETO, K.; OSUMI-YAMASHITA, N. Whole embryo culture and the study of postimplantation mammalian development. **Development, Growth and Differentiation**, v. 37, n. 2, p. 123–132, 1995.
- 69 LIN, C.-Y. et al. Enhancing protein expression in HEK-293 cells by lowering culture temperature. **PloS One**, v. 10, n. 4, p. e0123562, 2015.
- 70 PROBST, A. V; DUNLEAVY, E.; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 3, p. 192–206, 2009.

- 71 FULTON, C.; WEBSTER, C.; WU, J. S. Chemically defined media for cultivation of *Naegleria gruberi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 8, p. 2406–2410, 1984.
- 72 FULTON, C. Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. **Annual Review of Microbiology**, v. 31, p. 597–629, 1977. doi: 10.1146/annurev.mi.31.100177.003121.
73. VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Aplicada**. Inhumas: Instituto Federal de Ciência e Tecnologia, 2002. Disponível em: <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_aplicada.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2015.
- 74 FRITZ-LAYLIN, L. K. et al. *Naegleria gruberi* de novo basal body assembly occurs via stepwise incorporation of conserved proteins. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 860–865, 2010.
- 75 FRITZINGER, A. E. et al. Identification of a *Naegleria fowleri* membrane protein reactive with anti-human CD59 antibody. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1189–1195, 2006.
- 76 SMART. Disponível em: <<http://smart.embl-heidelberg.de/>>. Acesso em: 14 ago. 2014
- 77 TAMURA, T. et al. Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 46, p. 16162–16167, 2004.
- 78 NAEGLERIA.org. Disponível em: <<http://Naegleria.org/Home.html>>. Acesso em: 02 abr. 2014.
- 79 COSTA, F. C. **Validação da via de biossíntese de selenocisteína e selenoproteínas em Trypanosoma por RNA de interferência**. 2012. 177p. Tese (Genética evolutiva e biologia molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- 80 FULTON, C. Axenic cultivation of *Naegleria gruberi*. **Experimental Cell Research**, v. 88, n. 2, p. 365–370, 1974.
- 81 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.
- 82 STOCHAJ, W. R.; BERKELMAN, T.; LAIRD, N. Staining membrane-bound proteins with ponceaus. **CSH Protocols**, v. 2006, n. 5, 2006. doi: 10.1101/pdb.prot4543
- 83 DINGLE, A.D. Cellular and environmental variables determining numbers of flagella in temperature-shocked *Naegleria*. **Journal of Protozoology**, v. 26, n. 4, p. 604–612, 1979.
- 84 BURBIDGE, M. et al. At low monovalent cation concentrations K⁺ can have a specific effect on the amoeboid-flagellate transformation in *Naegleria gruberi*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 25, n. 2-3, p. 271–274, 1984.
- 85 COSTA, F. C. et al. Oxidative stress protection of Trypanosomes requires selenophosphate synthase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 180, n. 1, p. 47–50, 2011.
- 86 PROTPARAM. Disponível em <<http://expasy.org/tools/protparam.html>> Acesso em: 02 set. 2014.
- 87 LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D257–D260, 2015. doi: 10.1093/nar/gku949.
- 88 UNIPROT. Disponível em <<http://www.uniprot.org/uniprot/D2VMQ3>> Acesso em: 02 set.2014.

89 MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, p. D222–D226, 2015. doi: 10.1093/nar/gku1221.

90 CLUSTALW2. Disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>. Acesso em: 02 set. 2014.

91 STUDIER, F. W. et al. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. **Methods in Enzymology**, v. 185, p. 60-89, 1990. doi:10.1016/0076-6879(90)85008-C.

92 GE Health Care Protein Purification Handbook. Uppsala: GE Healthcare Bio-Sciences AB; 2014.

93 QIAexpressionist TM: a handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th ed. Hilden: Qiagen; 2003.

94 HAGEL, L. Unit 10.9: gel-filtration chromatography. In: AUSUBEL F. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley and Sons, 2001. doi: 10.1002/0471142727.mb1009s44

95 FAIM, L. M. et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of selenophosphate synthetases from *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. **Acta Crystallographica Section F: structural biology and crystallization communications**, v. 69, n. 8, p. 864–867, 2013.

96 DONG, A.; XU, X. et al In situ proteolysis for protein crystallization and structure determination. **Nature Methods**, v. 4, n. 12, p. 1019–1021, 2007.

97 WERNIMONT, A.; EDWARDS, A. In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update. **PloS One**, v. 4, n. 4, p. e5094, 2009.

98 PEPTIDECUTTER (ExPASy) Disponível em: <http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide_cutter/peptidecutter.pl>. Acesso em: 02 abr. 2015.

99 GREENFIELD, N. J. Circular dichroism. Disponível em: <<http://www.niu.edu/analyticallab/cd/handout.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

100 CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. **Biophysics Greenfield's chemistry: part II techniques for the study of biological structure and function**. Oxford: Freeman and Co.; 1980.

101 FASMAN, G. D. **Circular dichroism and the conformational analysis of biomolecules**. Boston: Springer, 1996.

102 THAKUR, A. S. et al. Improved success of sparse matrix protein crystallization screening with heterogeneous nucleating agents. **PloS One**, v. 2, n. 10, p. e1091, 2007.

103 McPHERSON, A. Introduction to protein crystallization. **Methods**, v. 34, n. 3, p. 254–265, 2004.

104 GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2527–2535, 2006.

105 OLSON, B. J. S. C.; MARKWELL, J. Unit 3.4: assays for determination of protein concentration. In: COLIGAN, J. E.(Ed.) **Current protocols in protein science**. New York: John Wiley and Sons, 2007. doi: 10.1002/0471140864.ps0304s48

106 BLATSp. Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>. Acesso em: 02 set. 2014

107 BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

108 TEKLE, Y.I. et al. Phylogenetic placement of diverse amoebae inferred from multigene analyses and assessment of clade stability within ‘Amoebozoa’ upon removal of varying rate classes of SSU-rDNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2008. doi:10.1016/j.ympev.2007.11.015