**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

JULIANA ROBERTA TORINI DE SOUZA

**Caracterização estrutural e funcional de duas Nucleosídeo Fosforilases de
*Schistosoma mansoni***

**São Carlos
2016**

JULIANA ROBERTA TORINI DE SOUZA

Caracterização estrutural e funcional de duas Nucleosídeo Fosforilases de
Schistosoma mansoni

Tese 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 Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Dr. Humberto D'Muniz Pereira

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2016

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)

Souza, Juliana Roberta Torini de
Caracterização estrutural e funcional de duas
Nucleosídeo Fosforilases de *Schistosoma mansoni* /
Juliana Roberta Torini de Souza; orientador Humberto
D'Muniz Pereira - versão corrigida -- São Carlos,
2016.
187 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2016.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Metiltioadenosina
fosforilase. 3. Purina Nucleosídeo fosforilase. 4.
Adenosina fosforilase. 5. Via de salvação de purinas.
I. Pereira, Humberto D'Muniz, orient. II. Título.

Ao meu marido Jeferson de Oliveira e aos meus pais Roberto e Neusa.

Dedico este trabalho com amor e gratidão, pela compreensão,
carinho e incansável apoio ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Dr. Humberto D'Muniz Pereira pela orientação, confiança, paciência e ensinamentos.

Ao Dr. José Brandão Neto pela orientação durante os trabalhos realizados no Diamond Light Source, agradeço a colaboração, preocupação, amizade e pela sempre disposição em ajudar.

Ao pesquisador Dr. Pierre Aller pela ajuda e amizade durante a cristalização das proteínas no OPFF.

A todos pesquisadores e funcionários do Oxford Protein Production Facility, em especial: Louise Bird, Joanne Nettleship, Ray Owens, Yamini Reddivari e Anil Verma.

Ao Dr. Julio César Borge do Instituto de Química de São Carlos, pela colaboração e pela imensa ajuda na análise dos dados de ITC.

Ao grupo de Bioquímica e Biofísica de proteínas do Instituto de Química de São Carlos, em especial à Dra. Fernanda Batista, pela amizade, pelas risadas, pela paciência e pela inenarrável ajuda nos experimentos com ITC.

À todo corpo docente, em especial àqueles responsáveis pelas disciplinas cursadas: Otávio Thiemann, Ana Paula Ulian de Araújo, Nelma Regina Segnini Bossolan, Leandro Martinez, Cristina Kurachi, Valtencir Zucolotto e Osvaldo Novais de Oliveira Junior (Chu).

As técnicas do grupo de Cristalografia Susana Andrea Sculaccio e Norma Bianca Saes, que sempre estavam prontas à ajudar, obrigada pela paciência.

As técnicas do grupo de Biofísica, Isabel de Moraes e Andressa Patricia Alves.

Às alunas Marília Mendes e Gabriela Viotto Sarro, pela colaboração ajuda e companheirismo.

A todos os alunos e professores, que estão ou que passaram pelo Laboratório de Biologia Estrutural, obrigada pela companhia, risadas, papos, ideias dicas etc, em especial à minha Amiga Jaqueline Evangelista cuja amizade se estendeu para além do laboratório, obrigada pelo companheirismo, pelos puxões de orelha, pelo incrível companheirismo, por me acolher, me ensinar e estar sempre ao meu lado durante todos esses anos.

A todos os funcionários do IFSC, em especial, aos do grupo de cristalografia, biblioteca, informática e pós-graduação, obrigada a todos pela incrível competência e respeito.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pela infra-estrutura e formação acadêmica.

A Capes, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos externos e familiares que compreenderam diversas ausências em eventos e aniversários, devido aos compromissos decorrentes desse trabalho.

A minha irmã, pela compreensão e lealdade.

Ao meu marido Jeferson de Oliveira, que sempre esteve ao meu lado desde o começo, me incentivando, me apoiando, ouvindo, mesmo sem entender nada, tudo o que eu tinha para contar, falar e desabafar. Obrigada por estar ao meu lado durante todos os momentos, em especial naqueles em que eu pensei em desistir, obrigada pelo carinho, amor e dedicação.

Aos meus pais por acreditar em mim, pela exemplar educação dada e simplesmente por tudo que sou.

À todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!

*“Não sei o que possa parecer
aos olhos do mundo, mas aos meus
pareço apenas ter sido como um menino
brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato
de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma
concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano
da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente”*

Isaac Newton

RESUMO

SOUZA, J. R. T. **Caracterização estrutural e funcional de duas Nucleosídeo Fosforilases de *Schistosoma mansoni***. 2016. 187p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

As doenças parasitárias são uma das maiores causas de morte em países em desenvolvimento, e recebem pouca ou nenhuma atenção das indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de terapias. Causada pelo parasita *Schistosoma mansoni* a esquistossomose mansônica afeta aproximadamente 259 milhões de pessoas no mundo sendo aproximadamente 6 milhões somente no Brasil. O *S. mansoni* não possui a via "de novo" para a biossíntese de bases púricas e depende integralmente da via de salvação para o suprimento dessas bases, portanto, essa via é um alvo em potencial. Agentes capazes de bloquear a atividade das enzimas participantes desta via atuam de forma inespecífica e são quase sempre tóxicos ao homem e por isso o estudo minucioso das pequenas diferenças encontradas entre as enzimas do hospedeiro e do parasita são de extrema importância. Uma diferença marcante entre a via de salvação de purinas do parasita e do hospedeiro humano é a presença de atividade para adenosina fosforilase, que no parasita é exercida por duas entidades distintas: pela enzima Metiltioadenosina fosforilase de *S. mansoni* (*SmMTAP*) e por uma enzima até então desconhecida. A enzima *SmMTAP* naturalmente converte 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina (MTA) em adenina livre, mas ao contrário do que é visto no hospedeiro, no parasita essa enzima atua preferencialmente na conversão de adenosina. Substituições encontradas no sítio ativo dessa enzima, podem explicar tamanha preferência pelo substrato alternativo, revelando mecanismos distintos da enzima humana. A enzima Purina nucleosídeo fosforilase de *S. mansoni* (*SmPNP*) converte inosina e guanosina à hipoxantina e guanina, respectivamente, mas não possui atividade catalítica para adenosina. No entanto, no genoma de *S. mansoni* é descrita uma isoforma para a *SmPNP* (*SmPNP2*), cuja atividade catalítica é desconhecida e, portanto, essa enzima pode também atuar na conversão de adenosina juntamente com a *SmMTAP*. Assim, os objetivos deste trabalho foram realizar estudos bioquímicos da ação da enzima *SmMTAP* e realizar a caracterização estrutural e funcional da enzima *SmPNP2*. Para isso, foram realizadas mutações no sítio ativo da *SmMTAP* (S12T, N87T, Q289L, S12T/N87T e S12T/N87T/Q289L), as mutantes da *SmMTAP* juntamente com a enzima *SmPNP2* foram clonadas, expressas de forma heteróloga e purificadas. Foram realizados ensaios de cristalização e cinéticos por espectrofotometria utilizando um sistema acoplado. A atividade da *SmPNP2* foi ainda avaliada por calorimetria e HPLC. Foram determinadas as constantes catalíticas da forma nativa e para os cinco mutantes da *SmMTAP* para cinco diferentes substratos. Foi determinada atividade catalítica da *SmPNP2* por 3 diferentes substratos: adenosina, inosina e citidina, as constantes catalíticas foram determinadas para os três substratos. Foram obtidos cristais para os mutantes da *SmMTAP* e da *SmPNP2*, que foram submetidos à difração de raios X nas linhas I04-1 e I02 do laboratório de radiação síncrotron *Diamond Light Source* (DLS). Foram resolvidas 9 estruturas dos mutantes da *SmMTAP* e 4 da proteína *SmPNP2*. Os dados cinéticos, juntamente com os dados estruturais, permitiram compreender mecanismos catalíticos e de interação das proteínas estudadas, complementando o conhecimento do metabolismo do parasita *Schistosoma mansoni* e revelando alvos em potencial para o desenvolvimento de fármacos específicos.

Palavras chave: *Schistosoma mansoni*. Metiltioadenosina fosforilase. Purina nucleosídeo fosforilase.

ABSTRACT

SOUZA, J. R. T. **Structural and functional characterization of two Nucleoside Phosphorylase from *Schistosoma mansoni***. 2016. 187p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The parasitic illness are the leading cause of deaths in developing countries, and receives little or no attention from drug companies to develop therapies. The schistosomiasis is caused by *Schistosoma mansoni* parasite and affects approximately 259 million people worldwide with 6 million only in Brazil. The *Schistosoma mansoni* parasite does not possess the "de novo" pathway for purine bases biosynthesis and depends entirely on salvage pathway for its purine requirement, therefore this pathway is a potential target. Compounds able to block the enzymes from this pathway, are not specific and are often toxic to humans, thus the thorough study about the particularity found between enzymes from host and parasite are extremely important. A notable difference between human and parasite metabolism, is the activity existence to Adenosine phosphorylase that in parasite is carried out by two distinct entities: by Methylthioadenosine phosphorylase (*SmMTAP*) and by a hitherto unknown enzyme. The *SmMTAP* enzyme, naturally converts 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine (MTA) to free adenine and in opposition to host, in the parasite this enzyme acts mainly in adenosine conversion. Substitutions found in the active site from *SmMTAP*, can explain the huge preference by alternative substrate and to expose a distinct mechanisms from human enzyme. The Purine nucleoside Phosphorylase from *S. mansoni* (*SmPNP*) converts inosine and guanosine to hypoxanthine and guanine, respectively, but it not possess catalytic activity to adenosine conversion. However in the *S. mansoni* genome there is a isoform to *SmPNP*, whose activity is unknown, thus is possible that *SmPNP2* enzyme also can to convert adenosine. This study aimed to perform biochemical studies to investigate the *SmMTAP* enzyme action and perform the structural and functional characterization of *SmPNP2*. For this propose was made site-directed mutagenesis (S12T, N87T, Q289L, S12T/N87T e S12T/N87T/Q289L). The *SmMTAP* mutants and *SmPNP2* enzyme were cloned, expressed by heterolog process and purified. Were perform kinetic assays by spectrophotometric method in a coupled system. The *SmPNP2* activity was also available by calorimetry and HPLC methods. Were determined the catalytic constants to wild and mutants *SmMTAP* to five different substrate. Was determinated to *SmPNP2* catalictical activity and kinetics parameters to three substrate: adenosine, inosine e cytidine. Were obtained crystals from *SmMTAP* mutants and *SmPNP2* enzyme, those crystals were submitted to X-rays diffractions in the I04-1 and I02 beamlines from *Diamond Light Source* (DLS). Nine structures were obtained from *SmMTAP* mutants and four from *SmPNP2* enzyme. The kinetics and structural data allowed understanding the catalytic and interaction mechanisms about the protein studied, supplementing the knowledge around *Schistosoma mansoni* metabolism and reporting potential targets for the specific drugs development.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Methylthioadenosine phosphorylase. Purine nucleoside phosphorylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Casal adulto de <i>S. mansoni</i> acoplado, mostrando a fêmea longa e delgada residindo no canal ginecóforo do macho.	27
Figura 2 - Ovos de <i>Schistosoma</i> sp..	28
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>Schistosoma</i> sp..	29
Figura 4 - Representação da expansão da esquistossomose no Brasil.	32
Figura 5 - Fórmula química do Praziquantel..	34
Figura 6 - Esquema da via de salvação de purinas em <i>S. mansoni</i>	37
Figura 7 - Trímero da MTAP de <i>Schistosoma mansoni</i>	40
Figura 8 - Alinhamento entre as isoformas da PNP em <i>Schistosoma mansoni</i>	41
Figura 9 - Estrutura do trímero da PNP1 de <i>S. mansoni</i> em forma de fitas..	42
Figura 10 - Gel SDS PAGE da expressão das <i>SmMTAP</i> 2M e 3M.	49
Figura 11 - Gel SDS PAGE da expressão da <i>SmMTAP</i> -3M em <i>E. coli</i> Rosetta™.	50
Figura 12 - Gel SDS PAGE da purificação das <i>SmMTAPs</i> mutadas.	51
Figura 13 - Variação de T_m dos mutantes em relação à <i>SmMTAP</i> nativa na ausência de ligantes.	53
Figura 14 - ΔT_m obtidos no ensaio de DSF para a <i>SmMTAP</i> nativa e mutantes na presença de diferentes substratos em relação às respectivas amostras de referência..	54
Figura 15 - Gráfico da diferença de ΔT_m dos mutantes em relação à ΔT_m da <i>SmMTAP</i> nativa na presença de diferentes substratos.	55
Figura 16 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de MTA pela <i>SmMTAP</i> nativa e mutantes.	58
Figura 17 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de ADN pela <i>SmMTAP</i> nativa e mutantes.	60
Figura 18 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de 2dADN pela <i>SmMTAP</i> nativa e mutantes.	62
Figura 19 - Ajuste de Michaelis-Menten para o substrato PO_4 pela <i>SmMTAP</i> nativa e mutantes.	64
Figura 20 - Gráfico da velocidade versus concentração de PO_4	66
Figura 21 - Ajuste de Michaelis-Menten para adenosina na ausência de fosfato pela <i>SmMTAP</i> nativa e os mutantes N87T, 2M e 3M.	67

Figura 22 - Cristais dos mutantes da <i>SmMTAP</i> no <i>loop</i> já alinhado para disparo dos raios X.	69
Figura 23 - Mapa da densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3.0 σ , para as mutações, A-S12T, B- Q289L e C- N87T.	73
Figura 24 - Estrutura trimérica do mutante N87T da <i>SmMTAP</i> e sobreposição dos 66 monômeros da <i>SmMTAP</i>	74
Figura 25 - Mapa de densidade Fo-Fc contornado a 3.0 σ para a molécula de adenina no sítio ativo do mutante S12T da <i>SmMTAP</i>	75
Figura 26 - Mapa de densidade Fo-Fc contornado a 3.0 σ para a molécula de MTA no sítio ativo do mutante S12T da <i>SmMTAP</i>	75
Figura 27 - Mapa de densidade Fo-Fc contornado a 3.0 σ para a molécula de tubercidina no sítio ativo do mutante Q289L da <i>SmMTAP</i>	76
Figura 28 - Imagem do movimento do <i>gate loop</i> induzido pela presença da adenina no sítio ativo.....	77
Figura 29 - Mapa de omissão composto contornado a 1 σ da região que contém a ligação SS na <i>SmMTAP</i>	78
Figura 30 - Diagrama LigPlot ⁺ para as interações do ligante no sítio ativo da <i>SmMTAP</i>	79
Figura 31 - Sítio de ligação da base da <i>SmMTAP</i> ocupado por uma molécula de adenina e uma de sulfato.	80
Figura 32 - Sobreposição das estruturas, em complexo com adenina na forma apoenzima e da cadeia C do mutante S12T-ADN.....	81
Figura 33 - Ligação de tubercidina e MTA no SLB.	82
Figura 34 – Modo de interação da porção ribose da tubercidina no SLR na <i>SmMTAP</i> nativa.	83
Figura 35 – Modo de interação da porção ribose da tubercidina no SLR no mutante Q289L da <i>SmMTAP</i>	84
Figura 36 – Modo de interação da molécula de MTA no SLR no mutante S12T da <i>SmMTAP</i>	85
Figura 37 - Sítio de ligação do sulfato/fosfato da <i>SmMTAP</i> em complexo com tubercidina.....	85
Figura 38 - Sobreposição do SLF das estruturas da <i>SmMTAP</i> nativa e do mutante N87T...	87
Figura 39 - Visualização da amplificação por PCR do inserto contendo a ORF do gene da enzima <i>SmPNP2</i>	98
Figura 40 - Visualização da expressão e purificação da <i>SmPNP2</i> em SDS-PAGE.....	99

Figura 41 - Visualização da clivagem ao longo do tempo e purificação reversa da <i>Sm</i> PNP2 em SDS-PAGE.	100
Figura 42 - Resultado da determinação da massa molecular da <i>Sm</i> PNP2 através da cromatografia de exclusão por massa molecular.	101
Figura 43 - ΔT_m do ensaio de DSF para a <i>Sm</i> PNP2 na presença de diferentes condições...	102
Figura 44 - Termograma da interação da <i>Sm</i> PNP2 com citosina.	105
Figura 45 - Termograma da determinação do ΔH_{app} da <i>Sm</i> PNP2 para os compostos ADN, CTN, GNO, NOS, THM e URN.	106
Figura 46 - Resultado dos ensaios cinéticos por calorimetria de titulação isotérmica para a <i>Sm</i> PNP2 com citidina.	108
Figura 47 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de adenosina pela <i>Sm</i> PNP2.	109
Figura 48 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise da inosina pela <i>Sm</i> PNP2.	111
Figura 49 – Cromatogramas da análise cromatográfica da formação ao longo do tempo de citosina a partir de citidina pela ação da <i>Sm</i> PNP2 na presença de fosfato.	112
Figura 50 – Cromatogramas da formação ao longo do tempo de citidina a partir de citosina e R1P pela ação da <i>Sm</i> PNP2.	114
Figura 51 - Cristais da <i>Sm</i> PNP2.	115
Figura 52 - Densidade eletrônica da estrutura da <i>Sm</i> PNP2- <i>apo</i> a 1,5 Å de resolução.	117
Figura 53 - A. Estrutura do trímero da <i>Sm</i> PNP2. B. Estrutura do monômero da <i>Sm</i> PNP2. .	118
Figura 54 - Interação dos resíduos na interface entre os monômeros A e B.	119
Figura 55 - Ligação de compostos oriundos do tampão de cristalização no sítio ativo da <i>Sm</i> PNP2.	120
Figura 56 - Sobreposição das estruturas, <i>Sm</i> PNP2 em complexo com MES e <i>Sm</i> PNP1 em complexo com NDSB195.	121
Figura 57 - Estrutura secundária da <i>Sm</i> PNP2 em função da sequência de aminoácidos	122
Figura 58 - Estrutura secundária e topologia do monômero da <i>Sm</i> PNP2.	123
Figura 59 - Alinhamento das PNPs de <i>S. mansoni</i> , humana e de <i>M. musculus</i>	124
Figura 60 - Diagrama LigPlot ⁺ para as interações dos ligantes no sítio ativo da <i>Sm</i> PNP2...	125
Figura 61 - Sítio de ligação da base das estruturas <i>Sm</i> PNP2-CYT e <i>Sm</i> PNP2-CYT-R1P. ..	126
Figura 62 - Formação da α -hélice 11 na <i>Sm</i> PNP2.	127
Figura 63 – Interações da cadeia lateral do resíduo N246 com os resíduos I248 e L249 do N-cap da α -hélice 11 na <i>Sm</i> PNP2.	128

Figura 64 - Sobreposição do sítio de ligação da base das estruturas <i>Sm</i> PNP2-CYT e <i>Sm</i> PNP1 em complexo com adenosina	129
Figura 65 - <i>Loop</i> fosfato nas <i>Sm</i> PNPs.	131
Figura 66 - Choque esterérico que impede a movimentação do <i>Loop</i> Fosfato na <i>Sm</i> PNP2.	132
Figura 67 - Sobreposição dos monômeros das estruturas PNP2 e PNP1 de <i>S. mansoni</i>	133
Figura 68 - Sobreposição da <i>Sm</i> PNP2 na forma APO com a <i>Sm</i> PNP1 para parte do sítio ativo.....	134
Figura 69 - Sobreposição da estrutura tridimensional da <i>Sm</i> PNP2 com a estrutura de PNP's de diferentes organismos depositadas no PDB.	135
Figura 70 - Visualização da amplificação por PCR do inserto contendo a ORF do gene da enzima <i>Sm</i> NDPK	156
Figura 71 - Visualização da purificação da <i>Sm</i> NDPK em SDS-PAGE.....	157
Figura 72 - Resultado dos ensaios cinéticos por calorimetria para a fosforilação do GDP a partir de ATP, catalisada pela <i>Sm</i> NDPK.....	158
Figura 73 - Cristais da <i>Sm</i> NDPK.	160
Figura 74 - Densidade eletrônica da estrutura da <i>Sm</i> NDPK1-apo.....	163
Figura 75 - Conteúdo da unidade assimétrica das estruturas da <i>Sm</i> NDPK.	163
Figura 76 - Vista estrutural da unidade funcional da <i>Sm</i> NDPK1.	164
Figura 77 - Interações entre a interface dos monômeros da <i>Sm</i> NDPK.....	165
Figura 78 - Estrutura secundária da <i>Sm</i> NDPK em função da sequência de aminoácidos	165
Figura 79 - Representação esquemática do β -Bulge e do β -Hairpin presentes na estrutura secundária da <i>Sm</i> NDPK.	166
Figura 80 - Estrutura secundária e topologia do monômero da <i>Sm</i> NDPK.	167
Figura 81 - Alinhamento da NDPK de <i>S. mansoni</i> e das NDPKs de <i>Toxoplasma gondii</i> , de <i>Drosophila melanogaster</i> e humanas A e B	168
Figura 82 - Esquema da superfície do trímero da <i>Sm</i> NDPK, evidenciando os bolsões catalítico, ocupados por uma molécula de ADP.	169
Figura 83 - Diagrama LigPlot ⁺ para as interações do ADP no sítio ativo da <i>Sm</i> NDPK.....	169
Figura 84 - Esquema do bolso catalítico da <i>Sm</i> NDPK, evidenciando as interações que ocorrem entre o ligante e os resíduos do sítio catalítico..	170
Figura 85 - Análise dos movimentos estruturais na <i>Sm</i> NDPK.	171
Figura 86 - Sobreposição da estrutura tridimensional da <i>Sm</i> NDPK-ADP com a estrutura <i>Hs</i> NDPK-A em complexo com ADP.....	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constantes catalíticas da <i>Sm</i> MTAP nativa e mutantes para a fosforólise de MTA.	58
Tabela 2 - Constantes catalíticas da <i>Sm</i> MTAP nativa e mutantes para a fosforólise de ADN.....	61
Tabela 3 - Constantes catalíticas da <i>Sm</i> MTAP nativa e mutantes para a fosforólise de 2dADN.....	63
Tabela 4 - Constantes catalíticas da <i>Sm</i> MTAP nativa e mutantes para o substrato PO ₄	65
Tabela 5 - Constantes catalíticas da <i>Sm</i> MTAP nativa e mutantes para adenosina na ausência de fosfato.....	67
Tabela 6 - Estruturas obtidas para os mutantes da <i>Sm</i> MTAP.	70
Tabela 7 - Valores de R _{free} e R das nove estruturas obtidas.	71
Tabela 8 - Análise das estruturas dos mutantes da <i>Sm</i> MTAP gerada pelo programa MolProbity.....	72
Tabela 9 - Composição das condições do Kit Silver bullets TM bio HR2-088, que ocasionaram aumento de T _m no ensaio de DSF para a <i>Sm</i> PNP2.....	103
Tabela 10 - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados para a <i>Sm</i> PNP2.	116
Tabela 11 - Análise das estruturas da <i>Sm</i> PNP2 gerada pelo programa MolProbity.....	117
Tabela 12 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos trímeros da <i>Sm</i> PNP2. Valores calculados pelo alinhamento no programa PyMOL.....	133
Tabela 13 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros da <i>Sm</i> PNP2 e monômeros de PNPs de diferentes organismos depositadas no PDB.	135
Tabela 14 - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados para a <i>Sm</i> NDPK.	161
Tabela 15 - Análise das estruturas da <i>Sm</i> PNP2 gerada pelo programa MolProbity.....	162
Tabela 16 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros da estrutura <i>Sm</i> NDPK-apo C2.....	172
Tabela 17 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros das estrutura <i>Sm</i> NDPK-apo C2, <i>Sm</i> NDPK-apo P6322 e <i>Sm</i> NDPK-ADP.	173

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2dADN	2'-deoxyadenosina
2FA	2-fluoroadenosina
A	Alanina
ADA	Adenosina desaminase
ADE	Adenina
ADK	Adenilato kinase
ADN	Adenosina
ADP	Adenosina difosfato
ADSL	Adenilosuccinato liase
ADSS	Adenilosuccinato sintase
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Adenosina kinase
AMP	Adenosina monofosfato
AP	Adenosina Fosforilase
APO	Apoenzima
APRT	Adenina fosforibosiltraferase
ATP	Adenosina trifosfato
BRENDA	<i>BRaunschweig ENzyme DAtabase</i>
C	Cisteína
CDP	Citidina Difosfato
CTN	Citidina
CTP	Citidina Trifosfato
CYT	Citosina
D	Ácido aspártico
D.O.	Densidade Optica
DesvPad	Desvio Padrão
DIMPLE	Difference Map PipeLinE
DLS	<i>Dimond Light Source</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSF	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i>
DTT	Ditiotreitol

E	Ác. Glutâmico
EDO	Etileno glicol
F	Fenilalanina
G	Glicina
GDP	Guanosina difosfato
GK	Guanilato kinase
GMPS	GMP-sintetase
GNO	Guanosina
GTP	Guanosina trifosfato
H	Histidina
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase
HMDB	Banco de dados de metaboloma humana
HPLC	<i>High Performance Liquide Chromatography</i>
HPX	Hipoxantina
I	Isoleucina
IMPDH	Inosina monofosfato desidrogenase
IPTG	Isopropil β -D-tiogalactopiranosideo
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>
K	Lisina
K_a	Constante de associação
k_{cat}	Constante Catalítica
K_d	Constante de Dissociação
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Leucina
M	Metionina
MG7	7-metilguanosina
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
MR1P	Metiltioribose 1 fosfato
MTA	5'-deoxi-5'-metiltioadenosina
MTAP	5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase
MW	<i>Molecular Weight</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Concentrator</i>
N	Asparagina

n	Estequiometria
NaCl	Cloreto de sódio
NDP	Nucleotídeo difosfato
NDPK	Nucleosídeo difosfato kinase
NOS	Inosina
NP-1	Nucleosídeo Fosforilases de baixo peso molecular
NTP	Nucleotídeo trifosfato
ORF	<i>Open reading frame</i>
P	Prolina
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCT	<i>Pre-Crystallization Test</i>
PDB	Protein data bank
PL	<i>Phosphate loop</i>
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoride
PNP	Purina nucleosídeo fosforilase
PNP2	Purina nucleosídeo fosforilase isoforma 2
PO4	Fosfato
PZQ	Praziquantel
Q	Glutamina
R	Arginina
R1P	Ribose 1 Fosfato
RCaHa	<i>Research Complex at Harwell</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RNA	Ácido ribonucleico
S	Serina
SLB	Sítio de ligação da Base
SLF	Sítio de ligação do fosfato
SLR	Sítio de ligação da Ribose
SS	Dissulfeto
T	Treonina
TBN	Tubercidina
TDP	Timidina Difosfato
THM	Timidina

T_m	Temperatura de <i>melting</i>
TTP	Timidina Trifosfato
UCK	Uridina Citidina Kinase
UP	Uridina Fosforilase
URI	Uridina
V	Valina
V_e	Volume de eluição
W	Triptofano
WHO	<i>World Health Organization</i>
Y	Tirosina
ΔG	Energia livre de Gibbs
ΔH	Variação da entalpia
ΔS	Entropia
ΔT_m	Variação da temperatura de <i>melting</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	O <i>Schistosoma</i> sp.	27
1.2	Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma</i> sp.	29
1.3	Histórico da esquistossomose	30
1.4	A esquistossomose	31
1.5	Diagnóstico da esquistossomose	33
1.6	Tratamento da esquistossomose.....	34
1.7	Metabolismo de Purinas em <i>S. mansoni</i>	36
1.8	Adenosina Fosforilase em <i>S. mansoni</i>	38
1.9	5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase de <i>S. mansoni</i> (<i>SmMTAP</i>)	39
1.10	Isoforma 2 da enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de <i>S. mansoni</i> (<i>SmPNP2</i>) ..	40
2	OBJETIVOS	43
2.1	Objetivo Geral.....	43
2.2	Objetivos Específicos.....	43
2.2.1	<i>SmMTAP</i>	43
2.2.2	<i>SmPNP2</i>	43
3	Enzima Metiltioadenosina Fosforilase de <i>S.mansoni</i> (<i>SmMTAP</i>).....	45
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1.1	Mutação, expressão e purificação	45
3.1.2	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF).....	46
3.1.3	Cinética Enzimática	46
3.1.4	Ensaio de Cristalização	47
3.1.5	Coleta, Processamento e refinamento dos dados	48
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.2.1	Mutação, expressão e purificação da enzima <i>SmMTAP</i>	48
3.2.2	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF)	52
3.2.3	Cinética enzimática da enzima <i>SmMTAP</i>	56
3.2.3.1	Cinética enzimática para a fosforólise de MTA.....	57
3.2.3.2	Cinética enzimática para a fosforólise de adenosina	59
3.2.3.3	Cinética enzimática para a fosforólise de 2'-deoxiadenosina.....	62
3.2.3.4	Cinética enzimática para o substrato PO ₄	63
3.2.3.5	Cinética enzimática para Adenosina na ausência de fosfato.....	66

3.2.4	Cristalização e co-cristalização dos mutantes da <i>SmMTAP</i>	68
3.2.5	Coleta e processamento dos dados de difração de raios X.....	69
3.2.6	Validação dos modelos.....	70
3.2.7	Análise estrutural da <i>SmMTAP</i> nativa e mutantes	72
3.2.8	Sítio ativo da <i>SmMTAP</i> nativa e mutantes.....	78
3.2.8.1	Sítio de Ligação da Base (SLB)	80
3.2.8.2	Sítio de Ligação da Ribose/Metiltioribose (SLR)	82
3.2.8.3	Sítio de Ligação da Fosfato (SLF).....	85
4	Enzima Purina Nucleosideo Fosforilase de <i>S.mansoni</i>	89
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS.....	89
4.1.1	Amplificação da ORF da <i>SmPNP2</i>	89
4.1.2	Ligação do produto de PCR em vetor pOPIN e transformação de células de propagação.....	89
4.1.3	Escolha das colônias e transformação de células de expressão.....	90
4.1.4	Expressão e purificação da <i>SmPNP2</i>	91
4.1.5	Cromatografia de exclusão por massa molecular	92
4.1.6	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF)	93
4.1.7	Ensaio por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	93
4.1.7.1	Ensaio de ligação (<i>Binding</i>).....	94
4.1.7.2	Ensaio cinético por ITC.....	95
4.1.8	Cinética enzimática por espectrofotometria	96
4.1.9	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	96
4.1.10	Ensaio de Cristalização	97
4.1.11	Coleta, Processamento e refinamento das estruturas obtidas	98
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
4.2.1	Amplificação e clonagem da <i>SmPNP2</i>	98
4.2.2	Expressão e purificação da enzima <i>SmPNP2</i>	99
4.2.3	Cromatografia de exclusão por massa molecular	100
4.2.4	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF)	101
4.2.5	Ensaio por calorimetria de titulação isotérmica (ITC).....	104
4.2.6	Cinética enzimática por espectrofotometria	109
4.2.6.1	Cinética enzimática para a fosforólise de adenosina.....	109
4.2.6.2	Cinética enzimática para a fosforólise de Inosina	111
4.2.7	Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	112

4.2.8	Cristalização e co-cristalização da <i>Sm</i> PNP2	115
4.2.9	Validação dos modelos	116
4.2.10	Análise estrutural da <i>Sm</i> PNP2	117
4.2.10.1	Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas	122
4.2.11	Sítio ativo da <i>Sm</i> PNP2	124
4.2.11.1	Sítio de ligação da base (SLB)	126
4.2.11.2	Sítio de ligação da ribose (SLR)	129
4.2.11.3	Sítio de ligação do Fosfato (SLF)	130
4.2.12	Comparações Estruturais	132
4.2.12.1	Comparação estrutural entre as quatro estruturas da <i>Sm</i> PNP2.	132
4.2.12.2	Comparação estrutural entre a <i>Sm</i> PNP2 e a <i>Sm</i> PNP1	133
4.2.12.3	Comparação estrutural entre PNPs de diferentes organismos.	134
5	CONCLUSÕES	137
6	PERSPECTIVAS	141
	REFERENCIAS	143
	APÊNDICE A - Enzima Nucleosídeo Difosfato Kinase de <i>S. mansoni</i>	151
	APÊNDICE B – Lista de Publicações Científicas	175
	ANEXO A - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados da <i>Sm</i> MTAP ..	176
	ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets TM bio HR2-088 da Hampton Research	176

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *Schistosoma* sp.

A família Schistosomatidae é pertencente ao filo Platyelmintho e classe Trematódea. Os parasitas representantes dessa família possuem corpo achatado dorsoventralmente e a cauda encurvada cerca de dez vezes mais longa que o corpo, são de simetria bilateral, sem segmentação. O sistema digestivo termina em um fundo cego, isto é, sem ânus. O aparelho excretor é protonefridial, com células vibráteis, terminando em um poro excretor situado na extremidade posterior do corpo. Possuem duas ventosas, uma afunilada na extremidade anterior, onde se encontra a abertura bucal (ventosa oral) e a outra, próxima à primeira, que é uma ventosa pedunculada (o acetábulo). (1)

Representantes desta família se diferenciam dos outros trematódeos principalmente por não serem hermafroditas, possuindo evidente dimorfismo sexual. Os machos são alongados com acentuada curvatura ventral, medindo de 6,65 a 12 mm de comprimento, a largura do corpo ao nível do acetábulo varia de 0,21 a 0,39 mm. Abaixo do acetábulo o corpo se apresenta mais largo e achatado, com as margens curvadas ventralmente, formando o canal ginecóforo, onde costuma ficar alojada a fêmea. As fêmeas são levemente mais longas e mais finas que os machos medem 6,43 a 12,24 mm de comprimento por 0,12 a 0,21 mm de largura ao nível do ovário, possuem corpo cilíndrico com largura máxima variando de 0,14 a 0,25 mm (2) (Figura 1).

Figura 1 - Casal adulto de *S. mansoni* acoplado, mostrando a fêmea longa e delgada residindo no canal ginecóforo do macho. **A** - Esquema morfológico do casal acoplado; **B** - Vermes acasalados corados por carmim clorídrico. Fonte: **A**. Adaptada de LOVERDE (3) ; **B**. CARVALHO (1)

Os Schistosomatidae eliminam ovos não operculados, de casca dupla e fina, em algumas espécies apresentam espinho na porção lateral ou terminal e são embrionados contendo os miracídios. (1) Em *S. mansoni*, os ovos são facilmente reconhecidos pela presença, exclusivamente, de espinho lateralmente e medem de 94 a 113 μm de comprimento por 43 a 57 μm de largura e o espinho mede de 23 a 34 μm de comprimento (2) (Figura 2). Os ovos são importantes na transmissão e são os responsáveis pela patogenicidade da esquistossomose. Em *S. mansoni* o casal de vermes produz aproximadamente 300 ovos por dia e aproximadamente metade é eliminado pelo hospedeiro e a outra metade é carregada até trato peritoneal onde forma granulomas provocando graves reações inflamatórias e sérias seqüelas intestinais. (4)

Figura 2 - Ovos de *Schistosoma* sp. **A** Ovo de *S. mansoni* em exame citológico a fresco; **B** - Ovo de *S. haematobium* em exame citológico a fresco de urina concentrada; **C** - Ovo de *S. japonicum* em exame citológico a fresco de fezes.
Fonte: LABORATORY... (5)

De todas as espécies de *Schistosoma* sp., seis são capazes de parasitar o homem, e somente a espécie *mansoni* é encontrada nas Américas. (6) Levando em consideração as características morfológicas dos vermes adultos, do espinho do ovo, do ciclo biológico, da especificidade pelo hospedeiro e pela genética, as espécies do gênero *Schistosoma* podem ser divididas em quatro grupos: Grupo japonicum (*S. japonicum*, *S. sinensium*, *S. mekongi* e *S. malayensis*), grupo haematobium (*S. haematobium*, *S. bovis*, *S. mattheei*, *S. margrebowiei*, *S. intercalatum* e *S. leiperi*), grupo indicum (*S. indicum*, *S. spindale*, *S. incognitum* e *S. nasale*) e grupo mansoni (*S. mansoni*, *S. rodhaini*, *S. hippopotami* e *S. edwardiense*). As espécies do grupo mansoni, em geral, realizam o ciclo assexuado em moluscos do gênero *Biomphalaria* (África, Américas Central e Sul), os espécimes são encontrados nos vasos mesentéricos e no sistema porta de mamíferos das ordens Primates, Rodentia, Artiodactyla e Carnivora. (1)

1.2 Ciclo evolutivo do *Schistosoma* sp.

O ciclo da doença inicia-se com o parasita fazendo a postura dos seus ovos nas veias mesentéricas do hospedeiro definitivo. Esses ovos atravessam as paredes das veias no intestino e são eliminados juntamente com as fezes. Na água, em condições ideais, os ovos eclodem liberando as larvas, chamadas de miracídeos. Os miracídeos penetram no corpo do caramujo e ali se transformam em um novo tipo larvário, o esporocisto, que por poliembrionia gera esporocistos-filhos que em seguida transformam-se em larvas chamadas cercária (forma infectante). As cercárias saem do caramujo e passam novamente para a água, podendo penetrar ativamente na pele humana ou outro vertebrado susceptível. As cercárias que não foram destruídas na pele, transformam-se rapidamente em esquistossômulo (última forma larval), e ganham a corrente sanguínea, chegando ao coração, pulmão, intestino ou fígado. No caso do *S. mansoni*, os esquistossômulos atingem o sistema portahepático e completam seu desenvolvimento alcançando a fase adulta, ali se acasalam e migram para as vênulas da parede intestinal, fechando o ciclo (7) (Figura 3).

ESQUISTOSSOMOSE

Figura 3 - Ciclo de vida do *Schistosoma* sp. Ovos são eliminados nas fezes ou urina **1**, em condições ideais há eclosão dos ovos e liberação de miracídeos **2**, que nadam e penetram em hospedeiro intermediário específico (moluscos) **3**. Os estágios no caramujo incluem duas gerações de esporocistos **4** e a produção de cercárias **5**. Após liberadas do caramujo, as cercárias infectantes nadam e penetram na pele do hospedeiro **6**, perdem sua cauda, passando a ser esquistossômulo **7**. Os esquistossômulos disseminam-se pelo sangue **8** e atingem o fígado onde se maturam na forma adulta **9**. Adultos emparelham-se e migram para o plexo venoso do intestino (*S. mansoni* e *S. japonicum*) ou plexo venoso da bexiga (*S. haematobium*) **10**. Os ovos são eliminados com as fezes ou urina, respectivamente. Fonte: LABORATORY... (5)

1.3 Histórico da esquistossomose

Acredita-se que a esquistossomose tenha se originado nas bacias do rio Nilo, na África, e do Yangtze, na Ásia. Ovos de *Schistosoma* sp. foram encontrados em vísceras de múmias egípcias cuja origem estimada é de 1.250 a.C. Igualmente, existem relatos de que na cidade de Cehang-lha, na China, foram encontrados ovos de *Schistosoma japonicum* em cadáver datados de aproximadamente 2.000 anos. (6)

O parasita *Schistosoma* sp., foi descoberto em maio de 1851 pelo patologista alemão Theodor Maximilian Bilharz que, realizando autópsias na cidade do Cairo, encontrou um helminto até então nunca visto na veia porta dos corpos em que trabalhava, por isso a doença é ainda hoje chamada de Bilharzia. Em agosto de 1851, Bilharz anunciou ter encontrado a fêmea do helminto que ele acabara de descobrir, esse fato foi recebido com muito espanto pela comunidade acadêmica daquela época, pois até então, todos os trematódeos eram conhecidamente hermafroditas. Em dezembro, por considerar como boca as duas ventosas encontradas e por habitar o sangue, Bilharz deu ao parasita recém descoberto o nome de *Distobium* (duas bocas) *haematobium*. Em 1852 a descoberta do parasita, foi oficialmente divulgada em um congresso de naturalistas em Gotha (Alemanha). (1)

Em 1958, Weinland e Cobbold observaram que somente uma ventosa continha a cavidade oral, e por isso passaram a chamar o parasita de *Schistosoma haematobium*, referindo-se ao corpo fendido do macho (schisto (fenda) e soma (corpo)), a partir desse nome, a doença causada por este parasita ficou conhecida como *schistosomiasis* (em português, esquistossomose). (1, 8)

Bilharz relatou também a presença de espinhos nos ovos, que podiam ser encontrados tanto na porção lateral como na porção terminal, entretanto em 1864, Harley estudando pacientes infectados no Cabo da Boa Esperança (África), concluiu que somente encontrava o espinho na porção terminal dos ovos. Em 1902, Patrick Manson estudando pacientes oriundos das ilhas de São Cristóvão e Antígua, no Caribe, que nunca estivera antes na África e que não apresentavam qualquer sintoma de hematúria (principal sintoma da doença causada pelo *S. haematobium*), relatou encontrar apenas ovos com espinhos na porção lateral, e que ainda esses ovos eram encontrados somente no reto, levantando-se assim a hipótese de que poderia tratar-se de uma nova espécie de *Schistosoma*. (8) Porém Arthur Looss, maior helmintologista da época, defendia que os ovos com espinhos laterais eram não mais que a forma infecundada dos ovos do *S. haematobium*. Quatro anos mais tarde, Sambom após analisar minuciosamente o

material publicado por Manson, sugeriu junto à Sociedade de Zoologia de Londres, a criação da nova espécie, denominando-a de *Schistosoma mansoni*, em homenagem ao seu colega. Mas a existência de uma nova espécie continuou a ser fortemente contestada, já que até então não havia evidências da diferença morfológica entre os vermes. (9)

Em 1908, o médico brasileiro Pirajá da Silva começou a estudar os primeiros casos de esquistossomose na Bahia e autopsiando indivíduos que vieram a falecer sob sua assistência e que expeliam ovos espiculados lateralmente pelas fezes, encontrou na veia porta os vermes adultos responsáveis pela postura dos ovos, em cópula desmentindo, portanto, o fato de que ovos com espinhos laterais eram oriundo de fêmeas não fecundadas. De posse dos vermes, Pirajá da Silva pôde examiná-los atentamente e perceber que tanto os machos quanto as fêmeas, diferiam morfológicamente dos parasitas descritos no Egito. A principal diferença encontrada nos machos foi a quantidade de massa testicular, e nas fêmeas a posição do ovário, a curta dimensão do útero e a distribuição das glândulas vitelogênicas (responsáveis pela maturação dos ovos). Em 1909 foi publicado por Pirajá da Silva, o primeiro documento contendo a descrição completa do *S. mansoni*. Em 1912, Pirajá da Silva descreve também, uma nova espécie de cercária que descobriu-se mais tarde ser a cercária de *S. mansoni*, e em 1915, quando Leiper trabalhava no Egito, identificou o hospedeiro intermediário do *Schistosoma* sp., o caramujo, fechando assim, o descobrimento do ciclo evolutivo do parasita. (8-9)

Desde o primeiro trabalho publicado em 1908 por Pirajá da Silva, houve dois marcos históricos importantes na luta contra a esquistossomose no Brasil: o mapeamento da doença no País e a criação, em 1975 do Programa Especial de Controle da Esquistossomose. Pela primeira vez, a esquistossomose foi tratada com prioridade correspondente a sua importância médico-social. Desde 1976, a implementação de medidas regulares de controle da esquistossomose no Brasil teve impacto sobre a prevalência e a intensidade das infecções humanas, diminuindo a frequência de formas hepatoesplênicas e o número de óbitos, mas não tem sido suficiente para impedir o aparecimento de novos casos e novas áreas endêmicas nos dias atuais. (10)

1.4 A esquistossomose

Entre as parasitoses que afetam o homem, a esquistossomose é uma das mais disseminadas no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, ocupa o segundo lugar depois da malária, pela sua importância e repercussão socioeconômica. A

esquistossomose é uma doença infecto parasitária, aguda e crônica. Também é conhecida como Bilharziose, Bilharzia, Xistose, Xistosa, Doença do Caramujo, Barriga d'Água e Doença de Manson-Pirajá da Silva.

Acredita-se que a introdução da esquistossomose no Brasil aconteceu por meio do tráfico de escravos originários da costa ocidental da África que ingressavam no país principalmente por Recife e Salvador para trabalharem nas lavouras de cana-de-açúcar. Uma vez introduzida a doença em nosso território, encontrou condições favoráveis à transmissão. Dos portos de entrada, a doença se expandiu inicialmente pelo nordeste brasileiro, formando extensa área de transmissão entre os estados do Rio Grande do Norte e Bahia. No século XVIII, com o início do ciclo do ouro e o declínio da produção açucareira no Nordeste, um fluxo migratório intenso introduziu a endemia em Minas Gerais (Figura 4) e constitui até hoje, um importante problema de saúde pública, especialmente nas regiões Nordeste e Sudeste do País.

(6)

sintomas iniciais são linfadenopatia, mal-estar, febre, hiporexia, tosse seca, sudorese, dores musculares, dor na região do fígado ou do intestino, diarreia, cefaleia e prostração, entre outros. Quando se inicia a oviposição, o doente apresenta-se ainda, abatido, com hepatomegalia e esplenomegalia dolorosas, taquicardia e hipotensão arterial. Os indivíduos que evoluem para a fase crônica podem apresentar graves sintomas como a necrose das áreas em torno dos granulomas, constipação intestinal crônica, presença de sangue nas fezes, fibrose hepática, hipertensão portal, hemorragia digestiva, hepatite crônica, cirrose, trombose portal. Na esquistossomose urogenital (*S. haematobium*), o sintoma mais comum é a hematúria (sangue na urina), e na fase crônica fibrose na bexiga e no ureter e até câncer nos rins. (6, 11)

Dados da Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) (11) revelam que quase 259 milhões de pessoas no mundo necessitaram de tratamento para esquistossomose em 2014, das quais 123,3 milhões eram crianças em idade escolar (estima-se que 90% dessas pessoas residem na África). A WHO relata ainda que, apenas 61,6 milhões receberam tratamento (cobertura global de 20,8%) e que, 700 milhões vivem em áreas de risco nos 78 países endêmicos, sendo que 54 estão localizados na Ásia, África e América.

Na América os países acometidos são Brasil, República Dominicana, Suriname e Venezuela. (11) O Brasil é o país com a maior área endêmica das Américas, onde 1.510.363 pessoas necessitaram de tratamento no ano de 2014. (12) Segundo o Ministério da Saúde, de 1984 a 2012 foram registradas 47.211 internações por complicação da doença, que resultaram em 16.095 mortes. (6) A esquistossomose, é ainda hoje um grande problema de saúde pública e está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício dos mais diversos afazeres. As pessoas são geralmente infectadas durante atividades agrícolas, domésticas e de lazer quando entram em contato com a água contaminada pelas cercárias.

1.5 Diagnóstico da esquistossomose

A esquistossomose pode ser confundida com diversas doenças, em função das manifestações diferentes que ocorrem durante sua evolução, por isso o diagnóstico de certeza só é feito por meio de exames laboratoriais, que pode ser feito de forma direta ou indireta. Os métodos diretos, baseiam-se basicamente na detecção dos ovos em amostras de fezes ou urina,

e os métodos indiretos, em mecanismos imunológicos, envolvendo reação de antígeno anticorpo no sangue. (6)

No caso da esquistossomose mansônica, a técnica mais utilizada pelos programas de controle e a mais recomendada pela WHO, é a técnica de KatoKatz, que é um método semi-quantitativo e qualitativo que consiste na visualização e contagem dos ovos corados utilizando microscopia óptica. Este é um método fácil e de baixo custo, contudo, essa técnica apresenta limitações, visto que nos casos de baixa carga parasitária a quantidade de ovos presente diminui podendo resultar em falso-negativos. (6, 11)

1.6 Tratamento da esquistossomose

A única forma de tratamento atualmente disponível é o uso do Praziquantel (PZQ), um derivado pirazino-isoquinoleínico, do grupo dos tioxantônicos (Figura 5). O praziquantel desregula os mecanismos que controlam o fluxo de cátions através das membranas celulares dos vermes, inibindo as enzimas que mantêm os gradientes de íons inorgânicos, estimulando a entrada de sódio e inibindo a de potássio, ocasionando despolarização nas células do parasita. Ativa a contração cálcio-dependente da musculatura e com isso há um rápido aumento da passagem de cálcio para o interior do parasita, ocasionando um aumento do tônus muscular, o que ocasiona forte contração muscular que imobiliza o verme segundos após seu contato com o PZQ. O praziquantel perturba também, o metabolismo glicídico dos vermes, havendo redução na captação de glicose e liberação aumentada de lactato. Estudos de microscopia eletrônica revelam que, após contato com o praziquantel, há degeneração do tegumento dos parasitas, que se apresentam cobertos de lesões vacuolares, principalmente na região anterior. (13)

Figura 5 - Fórmula química do Praziquantel. Nome IUPAC, (RS)-2-(Cyclohexylcarbonyl) -1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino (2,1- α) isoquinolin-4-one.
Fonte: CISTICID... (13)

O PZQ foi introduzido em 1996 na rotina de tratamento para esquistossomose, mas já era utilizado também contra outros parasitas como: *Fasciola hepatica*, *Paragonimus sp.*, *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Diphyllobothrium latum* e *Diphyllobothrium pacificum*. Mostrando assim, não ser específico para o combate do *Schistosoma sp.* Em relação à oxamniquina, que era o medicamento até então usado, observa-se que o PZQ apresenta os mesmos efeitos adversos, mesma manifestação de toxicidade e a mesma eficácia terapêutica, porém com custo mais baixo. Apesar disso, um dos problemas apontados no uso do PZQ é a disponibilidade. Dados da WHO, mostram que em 2014 somente 20.7% da população afetada teve acesso ao medicamento. (6, 11)

O PZQ possui índice de cura que aproxima-se de 80% para os adultos e de 70% para as crianças (6), mas o grande problema é que ele não é eficaz para o combate às formas imatura do *Schistosoma* e, portanto, deve ser administrada uma segunda dose após 2 semanas, o que faz com que em alguns casos haja uma baixa taxa de cura entre a população tratada, uma vez que os pacientes acabam não recebendo essa segunda dose. (14) A sua utilização é segura, porém por ser utilizado de forma inespecífica para diferentes cargas parasitária e diferentes estágio da doença, tem sido pouco eficaz nos casos mais avançados da doença, pois mesmo após a diminuição da carga parasitária a fibrose e a cirrose que acontecem em torno do granuloma são irreversíveis, causando ainda mesmo após a redução da carga parasitária, hipertensão portal, hemorragia, ascite, edema e insuficiência hepática severa, casos que quase sempre evoluem para óbito. (6)

Não existem relatos de casos fatais associados ao tratamento, mas de maneira geral, o PZQ é contraindicado à pacientes que apresentem insuficiência hepática, renal ou cardíaca, em estados de gravidez, amamentação, hipersensibilidade, desnutrição ou anemia acentuada, pessoas com infecções agudas ou crônicas, com histórico de epilepsia (convulsão) ou doença mental e em pacientes menores de dois anos ou maiores de 70 anos. Não existe evidências de que o PZQ provoque lesões tóxicas graves no fígado ou em outros órgãos e os efeitos colaterais são geralmente transitórios, dentre eles destacam-se: gosto metálico na boca, dor abdominal, diarreia, astenia, cefaléia, tonturas, febre, reações urticariformes, náuseas e sonolência, e mais raramente sintomas como alucinações, mudança de comportamento e convulsões, portanto, apesar de transitórios, os efeitos apresentados afetam a qualidade de vida e o rendimento do paciente durante o tratamento. (6)

Apesar de ser a única forma de tratamento o PZQ não é efetivo para a erradicação da doença, já que pacientes chegam a ser submetidos a até três vezes consecutivas a esse tratamento, e ainda voltam a apresentar a doença (15), uma vez que continuam residindo nas

áreas de risco e, portanto, são constantemente reinfectados. (16) Em um estudo realizado com 422 pacientes que excretavam ovos de *S. mansoni*, dos quais 41% apresentavam contagem maior que 1000 ovos por grama de fezes, verificou-se que após tratamento com PZQ houve um decréscimo de apenas 5% nos pacientes que apresentavam essa contagem de ovos, e ainda após o tratamento 90% dos pacientes foram positivos à presença do antígeno no sangue. (17)

Em algumas nações o uso do PZQ se estende a mais de 20 anos surgindo, portanto, uma grande preocupação quanto a seleção de parasitas resistentes a este composto. (18) A presença de resistência em cepas isoladas de *Schistosoma sp.* vem sendo observada desde 1996 (15), já tendo sido relatada em países como Egito, Senegal e China. (15, 18-19) Segundo o relatório da Vigilância Epidemiológica emitido em 2014, no Brasil não há relatos de cepas de resistentes (6), no entanto em 2015 foram isoladas cepas que resistiam à 1200 mg/Kg corpo do PZQ a partir de camundongos oriundos de Belo Horizonte (20), sendo que o uso recomendado é de 40-75 mg/Kg corpo (13, 21), mostrando que a presença de cepas resistentes, é mais que uma hipótese no Brasil. Apesar dos estudos serem feitos utilizando cepas isoladas de camundongos, não há garantias de que cepas com grande resistência nunca existirão entre a população afetada, e é essa a principal razão que faz com que a busca por novos medicamentos seja cada dia mais urgente.

1.7 Metabolismo de Purinas em *S. mansoni*

Nucleotídeos de purina são requeridos em todos os organismos para síntese de DNA, RNA e outros metabólitos. No *S. mansoni* essa necessidade é ainda mais acentuada já que a postura de ovos pode ser de centenas por dia durante anos. (22) Para que isso seja possível, o parasita necessita de uma atividade biosintética altamente especializada, para suprir sua necessidade de bases púricas.

Os nucleotídeos são obtidos pela via “*de novo*” que utiliza precursores simples para a síntese ou pela via de salvação que é a reutilização de vias pelas quais o organismo pode satisfazer seu requerimento pré-formado de purinas endógenas e exógenas. (23) Senft et al., (22) em seu trabalho sobre metabolismo de purinas em *S. mansoni*, mostraram que o verme quando incubado em meio contendo ¹⁴C-glicina (um precursor simples da síntese de purinas), após quatro horas e meia, incorporava apenas 5% desta glicina ao seu metabolismo, e o que havia sido incorporado permanecia na forma de livre aminoácido.

Senft et al., (22) mostraram ainda que o verme quando incubado em meio contendo ^{14}C -adenina pelo mesmo período, cerca de 28% era incorporada e encontrada em frações que continham AMP, ADP e ATP. Ainda quando o verme era incubado em meio contendo ^{14}C -hipoxantina, quantidades substanciais de ATP e GTP eram sintetizadas. (24) Estas evidências tanto mostram grande dependência de um suprimento externo de bases pré-formadas para a síntese de nucleotídeos, como demonstra a perda da via “*de novo*” de síntese de purinas. Esta evidência foi confirmada por Dovey et al. (25), mostrando que ao contrário do seu hospedeiro, o parasita *S. mansoni* depende integralmente da via de salvação para seu requerimento de purinas. (22, 24-26) Na Figura 6 encontra-se esquematizada a via de salvação de purinas em *S. mansoni*.

Figura 6 - Esquema da via de salvação de purinas em *S. mansoni*. ADA- adenosina desaminase, PNP - purina nucleosídeo fosforilase, HGPRT- hipoxantina guanina fosforibosiltransferase, APRT- adenina fosforibosiltransferase, AK - adenosina kinase, ADK - adenilato kinase, NDPK Nucleosídeo difosfato kinase, MTAP - 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase, ADSL - adenilossuccinato liase, ADSS - adenilossuccinato sintase, IMPDH - inosina monofosfato desidrogenase, GMPS - GMP-sintetase GK - guanilato kinase.

Fonte: Adaptado de SENFT (24)

1.8 Adenosina Fosforilase em *S. mansoni*

Em *S. mansoni*, a conversão direta de adenosina em AMP, mediada pela ação de uma AK, possui um menor papel na síntese de adenina, sendo que o principal caminho para a conversão de adenosina em AMP é através da via Adenosina > Inosina > Hipoxantina > IMP. (24, 27) No entanto, observou-se *in vitro*, que o *S. mansoni* é capaz de converter rapidamente adenosina em adenina quando fosfato é adicionado ao extrato de vermes. A rápida formação de adenina a partir de adenosina foi então atribuída ao fato de que o *S. mansoni*, ao contrário do seu hospedeiro, possui uma adenosina fosforilase (AP). (25-30) Em *S. mansoni*, a atividade fosforolítica para adenosina na via de salvação de purinas é realizada pela 5'-deoxi-5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase (EC 2.4.2.28) (31), no entanto, estudos revelaram que ao utilizar 5'-dClFormicina, um inibidor específico de MTAP, a atividade fosforolítica para 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina (MTA) era 100% inibida, enquanto que para adenosina a atividade era apenas 96% inibida, indicando haver mais de uma enzima capaz de fosforolisar adenosina na via de salvação de purinas. O mesmo estudo, conclui ainda que essa segunda enzima é distinta da *SmPNP*, já que o 5'-dClFormicina não foi capaz de inibir a atividade fosforolítica para inosina (NOS) e guanosina (GNO). (32)

Buscas no transcriptoma do parasita mostram (33-34) que na via de salvação, há ainda a presença de uma isoforma da enzima *SmPNP* (*SmPNP2*), cujo papel metabólico não é definido. Como, já se sabe a *SmPNP* não é responsável pela conversão de adenosina em adenina na via de salvação de purinas (35), portanto, é possível que essa isoforma esteja envolvida nessa conversão juntamente com a *SmMTAP*. Mesmo confirmando esta hipótese, é certo que a *SmPNP2* exerça um papel principal ainda desconhecido na via de salvação de purinas, pois a atividade fosforolítica frente à *SmMTAP* é muito baixa e, portanto, não justificaria o gasto energético para expressar uma enzima que realize de forma ineficaz o papel catalítico que a *SmMTAP* exerce com maestria.

A presença de uma ou duas adenosinas fosforilases na via de salvação de purinas em *S. mansoni* é extremamente importante, já que além de ser vital para o parasita, não há uma enzima capaz de atuar como a AP em humano. Assim, o estudo e a caracterização dessas enzimas se tornam fundamental para a busca de quimioterápicos eficientes e menos tóxicos para o homem.

1.9 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina fosforilase de *S. mansoni* (*SmMTAP*)

O gene codificante para a *SmMTAP* o Smp_028190 codifica uma proteína com 299 resíduos que é 47% idêntica a MTAP humana (*HsMTAP*), e é identificada em diversos organismos. (36-40) Sua atividade foi primeiramente descrita em 1969 por Pegg e Williams-Ashman (41) quando estudavam tecido da próstata de ratos.

Em humanos, na via de síntese de poliaminas, 2 moléculas do nucleosídeo 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina (MTA) são geradas durante a conversão de putrecina à espermina pela ação das enzimas espermina e espermidina sintase. Essas moléculas de MTA são utilizadas pela enzima MTAP (EC 2.4.2.28), que atua convertendo esse nucleosídeo à adenina e 5-metil-5-tio- α -D-ribose 1-fosfato (MR1P). A adenina é salva pela ação da enzima APRT e o MR1P é convertido em metionina na via de salvação de metioninas. (42) A grande vantagem da via de síntese de poliaminas é a manutenção do enxofre no meio intracelular, através da reciclagem desse elemento presente no grupo tiol dos metabólitos envolvidos. Os metabólitos contendo enxofre, são salvos na via de salvação de metioninas, um aminoácido essencial e limitante principalmente nos eucariotos superiores que dependem de suprimentos externos para sua obtenção e ainda, que vivem em ambientes com escassez de enxofre. (43)

O estudo da atividade cinética da *SmMTAP* revela uma preferência desta enzima (menor valor de K_M), por adenosina em vez de seu substrato natural (MTA). Em comparação com a MTAP humana, a eficiência na ligação de adenosina é aproximadamente 100x maior na *SmMTAP* (31) sugerindo, portanto, que em *S. mansoni* essa enzima atua principalmente na via de salvação de purinas o que confirmaria, portanto, os trabalhos (25-30) que previam a presença de uma adenosina fosforilase nesta via.

A estrutura da *SmMTAP* é similar às Nucleosídeo Fosforilases de baixo peso molecular (NP-1), é um trímero de subunidades idênticas relacionadas por um eixo de simetria de ordem 3 (Figura 7). Consiste em um barril distorcido central contornado por α -hélices (31), como na MAP humanas. (44)

Figura 7 - Trímero da MTAP de *Schistosoma mansoni*. Em amarelo, ligantes na interface entre as subunidades. Estrutura secundária em diferentes cores: Helices em rosa; *Loops* em cinza; Folhas em azul.
Fonte: SOUZA (31)

A *SmMTAP* possui algumas características em comum com as que são encontradas em mamíferos, como baixo valor de K_M (Constante de Michaelis-Menten) para o seu principal substrato natural (MTA). Mas, no entanto apresenta uma importante diferença, a MTAP de *S. mansoni* apresenta um K_M extremamente baixo (1,94 μM) (31) em relação ao K_M da *HsMTAP* (184 μM) (45) para o substrato adenosina. Três substituições em relação a proteína humana foram encontradas no sítio catalítico desta enzima, sendo duas no sítio de ligação do fosfato (S12T e N87T) e uma no sítio de ligação da ribose (Q289L) (*Schistosoma*:humano), que podem explicar como se deu a especialização desta proteína para o substrato adenosina. (31)

1.10 Isoforma 2 da enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *S. mansoni* (*SmPNP2*)

A PNP (EC 2.4.2.1) é a enzima que catalisa a fosforólise reversível de nucleosídeos de purinas para gerar a base púrica correspondente e ribose-1-fosfato (46), bem como muitos nucleosídeos análogos. Duas isoformas desta proteína foram identificadas no genoma do *S. mansoni*, denominadas *SmPNP1* (AF321922.1) e *SmPNP2* (Smp_179110) que, apesar de possuírem exatamente o mesmo número de resíduos (287), possuem apenas 61,3% de identidade entre si, valor relativamente baixo tratando-se de isoformas para uma mesma enzima (Figura 8).

<i>SmpNP1</i>	MHESVTANIENVKKVAHHIQKLTSIVPEIGIICGSGLGKLADGVKDKITIPYTKIPNFPQ
<i>SmpNP2</i>	MTTPVVANYENASMAADYIKRVSNVLPDIGIICGSGLGKLIIEEIEERKVIPIYINIPNFPK
	* .*. ** **.. *. :*: :*
<i>SmpNP1</i>	TSVVGHSNLI FGTL SGRKVVVMQGRFMYEGYSNDTVALPIRVMKLLGVKILMVSNAAG
<i>SmpNP2</i>	TTVAGHVGNLV LGSVGGRKIVAMQGR LHMYEGYSNQEI ALPIRVMKLLGVRVLLITNLAG
	:. ** **: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :* **
<i>SmpNP1</i>	GLNRSKL GDFVILKDHIYLPGLGLNNILVGPNQEAFGTRFPALSNAYDRDLRKLAVQVA
<i>SmpNP2</i>	GINRKLKSGDFVLIKGHINFPLGLNNVLVGPNQDEFGPRFPDLSNAYDRLLQQLALKIA
	:. ** **: :*: :*. ** :*: :*: :*: :*: :*: :*. ** **: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*
<i>SmpNP1</i>	EENGFGNLVHQGVYVMNGGPCYETPAECTMLLNMGCDVVGMSIPEVVIARHCGIQVFAV
<i>SmpNP2</i>	QENDFQDLVHEGVYAFNGGPTYESPDESMLLKLGC DVVGMS TVPEVIIACHCGIKVLAV
	:*. * :*: :*: :*: :*: :*: :* *. ** :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*
<i>SmpNP1</i>	SLVTNISVL DVESDLKPNHEEVLATGAQRAELMQSWFEKIIIEKLPKD
<i>SmpNP2</i>	SLIANNSILDAENDVSINHEKVLAVAEKRADLLQMWFEKIIITRLPLD
	** :*: * :*: :*. * :*. ** :*: :*. ** :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*

Figura 8 - Alinhamento entre as isoformas da PNP em *Schistosoma mansoni*. As sequências possuem apenas 61,3% de identidade sequencial entre si. Em destaque o único resíduo substituído, dentre aqueles que interagem diretamente com o ligante no sítio ativo.

Fonte: Elaborada pela autora

A *SmpNP1* foi a primeira enzima da via de salvação de purinas em *S. mansoni* que teve sua estrutura determinada. Assim como a *SmpMTAP*, ela compartilha das mesmas características das PNPs de baixo peso molecular, ela é um trímero em solução e na forma cristalina com subunidades idênticas e com eixo de simetria de ordem 3, a interface entre os monômeros possui extensa interação (47-48), além de possuir um barril distorcido central contornado por α -hélices (Figura 9).

Figura 9 - Estrutura do trímero da PNP1 de *S. mansoni* em forma de fitas. Estrutura secundária em diferentes cores: Helices em vermelho; *Loops* em cinza; Folhas em azul.
Fonte: PEREIRA (48)

Pereira et al. (49) confirmaram que a *SmPNP1* não é a enzima responsável pela fosforólise da adenosina na via de salvação de purinas, pois através de estudos cinéticos e estruturais, mostraram que apesar da adenosina (ADN) se ligar de forma idêntica à inosina (NOS), a *SmPNP1* não é capaz de catalisar a reação com adenosina. Sendo a adenosina, um inibidor para *SmPNP1* com um IC_{50} de 82,3 μ M.

Como já mencionado na seção 1.8, diversos autores descreveram atividade para uma adenosina fosforilase na via de salvação de purinas em *S. mansoni* (25-27), cuja atividade foi atribuída à enzima *SmMTAP* (31). No entanto em 2014 Savarese et al. (32) mostram que um inibidor natural de MTAPs inibiu apenas 96% da fosforólise da adenosina sugerindo que uma segunda enzima atue juntamente com a *SmMTAP* nessa conversão. Através da análise sequencial das isoformas *SmPNP1* e *SmPNP2* pode-se observar que os resíduos catalíticos são conservados, com exceção de uma alanina na posição 118 que é substituída por uma leucina na *SmPNP2* (Figura 8). Portanto, é possível que a adenosina se ligue igualmente à *SmPNP2*, mas acreditamos que diferentemente da *SmPNP1*, a *SmPNP2* seja capaz de catalisar adenosina, sendo responsável, portanto, pelos 4% restante de atividade fosforolítica após inibição da *SmMTAP*. Mas um fato nos intriga, seria possível que as pressões seletivas sobre um organismo parasita, mantivesse ativo um gene cuja proteína exerça unicamente uma atividade ínfima frente à uma enzima altamente capacitada como a *SmMTAP*? Por isso, hipotetizamos que a fosforólise da adenosina pela *SmPNP2*, caso se confirme, seja uma reação secundária havendo, portanto, um papel metabólico principal ainda desconhecido na via de salvação de purinas ou mesmo em outras vias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar de forma detalhada o mecanismo catalítico da *SmMTAP*, identificando os fatores que contribuem para sua especialização na fosforólise da adenosina.

Determinar o(s) substrato(s) específico(s) da enzima *SmPNP2*, bem como sua função no metabolismo de *S. mansoni*, através da caracterização bioquímica e da determinação das constantes catalíticas e da estrutura tridimensional da enzima.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 *SmMTAP*

1. Realizar mutações sítio dirigidas, para investigar o efeito das substituições encontradas no sítio ativo da enzima *SmMTAP* em relação à MTAP humana.
2. Expressar e purificar satisfatoriamente os mutantes obtidos.
3. Determinar as constantes catalíticas dos mutantes da *SmMTAP*.
4. Cristalizar os mutantes da *SmMTAP* com diferentes substratos e/ou inibidores.
5. Realizar experimentos de difração de raios X com cristais obtidos.
6. Resolver, refinar e analisar as estruturas.

2.2.2 *SmPNP2*

1. Clonar a fase aberta de leitura (*Open reading frame* - ORF) do gene da *SmPNP2* em vetor pOPIN para expressão em múltiplos hospedeiros.
2. Expressar e purificar satisfatoriamente a enzima *SmPNP2*.
3. Determinar o(s) substrato(s) da enzima *SmPNP2* (Determinação da função metabólica).
4. Determinar as constantes catalíticas da *SmPNP2*.
5. Cristalizar a *SmPNP2* com diferentes substratos e/ou inibidores.
6. Realizar experimentos de difração de raios X com cristais obtidos.
7. Resolver, refinar e analisar as estruturas.

3 Enzima Metiltioadenosina Fosforilase de *S.mansoni* (SmMTAP)

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Mutação, expressão e purificação

Para investigar o efeito das substituições encontradas na SmMTAP em relação a enzima humana (31), foram feitas três mutações pontuais: S12T, Q289L e N87T; uma mutação dupla: S12T/N87T (mutante 2M); e uma mutação tripla: S12T/N87T/Q289L (mutante 3M).

O plasmídeo pET28a contendo a ORF do gene da SmMTAP (Smp_028190) foi enviado à empresa Mutagenex[®], que realizou as mutações pontuais e utilizou o produto para transformar bactérias *E. coli* JM109, e para a empresa Celco Biotech company, que realizou as mutações dupla e tripla e utilizou o produto para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3). As empresas confirmaram a presença das mutações, através do sequenciamento plasmidial.

As bactérias contendo a ORF mutada, foram pré-inoculadas em meio LB suplementado com 70 µg/mL de kanamicina e mantidas sob agitação a 37 °C por 16 horas. Para a expressão foi utilizado 500 mL de meio 2xTY para cada mutação, suplementado com kanamicina e inoculado com a cultura crescida anteriormente. Os tubos foram mantidos sob agitação (250 rpm) até que a D.O. a 600 nm fosse igual ou superior a 0,6. A indução foi feita com 0,1 mM de isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e as culturas foram mantidas a 18 °C por 16 horas. O produto da expressão foi centrifugado por 45 minutos a 4700 g. Descartou-se o sobrenadante, o pellet foi suspenso em 50 mL de tampão de lise (50 mM Fosfato de Sódio pH 7,4, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol e 5 mM β mercaptoetanol). As bactérias foram então lisadas por sonicação (6 pulsos de 1 minuto com intervalo de 30 segundos entre os pulsos) e novamente centrifugadas por 20 minutos a 9000g.

Para a purificação, foi utilizada cromatografia de afinidade, utilizando a resina cromatográfica de cobalto (Co-NTA agarose, Clontech). Aplicou-se o lisado na coluna de afinidade e então a coluna foi lavada com 10 volumes de tampão de lavagem (50 mM Fosfato de Sódio pH 7,4, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol e 5 mM β mercaptoetanol). Para a eluição, foi utilizado 1,5 volumes de tampão de eluição (50 mM Fosfato de Sódio pH 7,4, 300 mM NaCl, 200 mM imidazol e 5 mM de β mercaptoetanol). A proteína já purificada foi concentrada em concentrador Amicon[®] e dialisada contra tampão de diálise que variou de acordo com o ensaio realizado. Todos os passos foram analisados por SDS-PAGE.

3.1.2 Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Para avaliar de maneira rápida o efeito das mutações sobre a estabilidade da proteína na presença de seus substratos, produtos e/ou inibidores, foram realizados ensaios de DSF para a proteína *SmMTAP* nativa e seus mutantes pontuais (S12T, N87T, Q289L). Para esses ensaios, a cauda de histidinas fusionada à proteína, foi clivada pela ação da protease trombina, foi utilizada 1 U de trombina para clivar 100 µg de proteína. A proteína foi então dialisada em tampão HEPES (20 mM HEPES pH 7,5; 200 mM NaCl e 5 mM β mercaptoetanol).

Esses ensaios foram realizados no equipamento CFX96 Real-Time System da Bio Rad que foi programado para equilibrar as amostras a 25 °C por 5 min e então aumentar a temperatura até 95 °C, numa taxa de 0,5 °C/min. O fluoróforo usado foi o SYPRO® Orange (Life Technologie). Inicialmente foi realizado um teste de concentração de proteína versus concentração de SYPRO® Orange para verificar em qual proporção obtinha-se o melhor sinal de fluorescência. As concentrações testadas variaram de 2,5 a 7,5x de SYPRO® Orange versus 1 a 6 µM de proteína.

Avaliou-se a estabilidade da proteína na presença dos seguintes substratos: MTA, ADN, fosfato (PO₄), 2'-deoxyadenosine (2dADN), 2-fluoroadenosina (2FA) e tubercidina (TBN). Todas as reações foram feitas em triplicatas, sempre acompanhadas de um controle sem a presença de ligantes. As soluções finais foram colocadas em placa de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de 96 poços com auxílio de pipetas multicanal. A intensidade de fluorescência foi gerada em função da temperatura, obtendo-se uma curva sigmoidal. A partir do ponto de inflexão da curva, foi estimada a temperatura à qual 50% das moléculas de proteína se encontram na forma desnaturada (Temperatura de *Melting* - T_m). Os dados foram posteriormente analisados, utilizando o programa Microsoft Excel.

3.1.3 Cinética Enzimática

Para os ensaios de cinética enzimática, a proteína *SmMTAP* nativa e seus mutantes, foram dialisados em tampão fosfato (20 mM fosfato de potássio pH. 7,4; 200 mM de NaCl e 5 mM de β mercaptoetanol) ou tampão HEPES (20 mM HEPES pH. 7,4; 200 mM de NaCl e 5 mM de β mercaptoetanol), dependendo do substrato a ser utilizado. Os ensaios foram realizados por espectrofotometria, no espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices), utilizando placas UV-Star® (Greiner) de 96 poços. A reação era iniciada sempre, pela adição da enzima com auxílio de pipetas multicanais. Os ensaios foram baseados no método descrito por

Buckoreelall, K. et al (50) que mede indiretamente a formação de adenina, através da formação de 2,8-dihidroxiadenina, produzido pela oxidação da adenina pela Xantina Oxidase (XO) a 305 nm. Nesta condição o $\Delta\epsilon$ para a conversão de MTA ou ADN em 2,8-dihidroxiadenina é 15,2 (mM.cm)⁻¹. Para a conversão da absorbância medida ao longo do tempo em taxa de formação de produto, foi utilizada a equação de Lambert-Beer na qual diz que a absorbância é igual ao coeficiente de extinção molar, vezes a concentração de produtos, vezes o caminho óptico ($A = \epsilon \cdot C \cdot L$).

Os parâmetros cinéticos (k_{cat} , K_M e V_{max}) foram determinados para os substratos: MTA, ADN, PO₄ e 2dADN. As reações continham sempre 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,4; 0,3 U/mL de XO e concentração de enzima constante que foi ajustada entre 75 a 500 nM para um volume final de 200 μ l. Para o substrato PO₄, na reação descrita acima, o tampão fosfato foi substituído por tampão HEPES na mesma proporção e acrescentado 100 μ M de ADN. A concentração dos substratos utilizados variou da seguinte maneira: de 0 - 5 mM para PO₄ e de 7,5 - 40 μ M para os demais substratos. Após iniciada a reação, a D.O. a 305 nm foi imediatamente monitorada por 10 minutos.

Foram monitorados simultaneamente 8 diferentes concentrações de substratos. As medidas foram feitas em sextuplicatas, e os valores de k_{cat} , K_M e V_{max} foram determinados a partir dos dados coletados utilizando-se o programa de bioestatística para cinética enzimática GraphPad Prism 5, que contém um sistema interativo para desempenhar a análise gráfica não linear de melhor ajuste.

3.1.4 Ensaios de Cristalização

Para os ensaios de cristalização, a SmMTAP nativa e seus mutantes foram dialisadas em tampão Tris (20 mM de Tris pH 7,4; 200 mM NaCl; 10 mM de β mercaptoetanol). Foi utilizada a técnica de difusão de vapor em “gota suspensa”, cujo volume foi de 3 μ L de solução de proteína em concentrações que variaram de 5 a 10 mg/mL e 3 μ L de solução de cristalização. As gotas foram montadas em placas tipo limbro de 24 poços, sendo que em cada poço foi adicionado 500 μ L de solução de cristalização. As soluções de cristalização utilizadas foram: tampão Bis-Tris ou MES variando o pH de 6,1 a 6,7 e a concentração de PEG 3350 variando de 14 a 18%, essas condições foram pré-estabelecidas e otimizadas para a SmMTAP nativa. (31) Foram feitos também ensaios de co-cristalização das enzimas mutadas com seus ligantes e inibidores. Nestes ensaios, foi acrescentado ao tampão de diálise 2 mM de sulfato de amônio

e após diálise, a enzima foi concentrada e incubada por 16 horas com 5 mM de Ribose-1-fosfato, MTA, ADN, 2dADN ou tubercidina.

3.1.5 Coleta, Processamento e refinamento dos dados

Os cristais obtidos, foram crioprotetidos e enviados para coleta de dados no síncrotron *Dimond Light Source* (DLS) situado no *Research Complex at Harwell* (RCaH), UK. Os conjuntos de dados foram obtidos nas linhas I04-1 e I02 do DLS. Para o processamento dos dados foram utilizados os programas xia2 (51) e XDS. (52) As estruturas foram determinadas no programa *Phaser* (53) por substituição molecular usando, a estrutura da *SmMTAP* nativa (pdb:4L5Y) como modelo. Para o refinamento foi empregado o programa *Phenix* (54) e para a visualização dos mapas de densidade eletrônica e construção dos modelos, o programa *COOT* (55) usando os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. Para todas as estruturas obtidas, a variação do R_{Free} (56) foi usada como principal critério de validação do protocolo de refinamento e a qualidade estereoquímica do modelo foi avaliada pelo programa *Molprobit*. (57)

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Mutação, expressão e purificação da enzima *SmMTAP*

Foram feitas separadamente três mutações pontuais na enzima *SmMTAP*: S12T, N87T e Q289L; uma mutação dupla: S12T/N87T (mutante 2M); e uma mutação tripla: S12T/N87T/Q289L (mutante 3M). As mutações foram feitas pelas empresas *Mutagenex*[®], que realizou as mutações pontuais, e *Cellco Biotech company* que realizou a mutações dupla e tripla. Essas empresas, são especializadas em mutagênese *in vitro*. Para confirmar as mutações, foi feito o sequenciamento dos clones e posteriormente o alinhamento com a *SmMTAP* nativa para evidenciar as mutações.

A mutação dupla (S12T/N87T) foi feita a partir da ORF do gene da *SmMTAP* contendo a mutação S12T, e a mutação tripla (S12T/N87T/Q289L) foi feita a partir da ORF do gene da *SmMTAP* duplamente mutada. Os vetores contendo a ORF pontualmente mutada, foram usados para transformar bactérias *E. coli* JM109 enquanto os vetores contendo a ORF dupla e triplamente mutada, foi usado para transformar bactérias *E. coli* BL21 (DE3). Essas bactérias

foram pré-inoculadas em meio LB para posterior expressão, que aconteceu sob agitação a 37 °C por 16 horas.

As SmMTAPs mutadas, assim como a proteína nativa, foram satisfatoriamente expressas, indicando que a presença das mutações pontuais e até mesmo da mutação dupla, não interferiu no processo de expressão nem no enovelamento protéico. No entanto, como pode ser visto na Figura 10, não houve expressão satisfatória da SmMTAP-3M em *E. coli* BL21 (DE3).

Figura 10 - Gel SDS PAGE da expressão das SmMTAP 2M e 3M. 1 – Marcador de peso molecular; 2- Expressão da SmMTAP-2M antes da indução com IPTG; 3- Expressão da SmMTAP-2M após indução com IPTG; 4 - Expressão da SmMTAP-3M antes da indução com IPTG; e 5 - Expressão da SmMTAP-3M após indução com IPTG. A seta aponta para o local onde deveria aparecer uma banda referente à expressão da SmMTAP - 3M (~34,5 KDa).

Fonte: Elaborada pela autora

Uma vez que não houve expressão satisfatória da SmMTAP-3M em *E. coli* BL21 (DE3), o plasmídeo contendo a ORF mutada, foi extraído das células de expressão, utilizando o kit de purificação Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), e utilizados para transformar bactérias competentes *E. coli* da linhagem Rosetta™. Foram escolhidas duas colônias para realizar a nova expressão, que foi feita exatamente como citado na seção 3.1.1. Como pode-se observar na Figura 11 abaixo, a expressão a partir de células *E. coli* Rosetta™ foi satisfatória.

Figura 11 - Gel SDS PAGE da expressão da *SmMTAP*-3M em *E. coli* Rosetta™. 1 – Marcador de peso molecular; 2 e 4 - Expressão da *SmMTAP*-3M antes da indução com IPTG; 3 e 5 - Expressão da *SmMTAP*-3M após indução com IPTG. As setas apontam para as bandas referentes à *SmMTAP*-3M (~34,5 kDa).
Fonte: Elaborada pela autora

Uma análise na sequência da *SmMTAP* revelou a presença de códons raros para os aminoácidos leucina (L) e treonina (T), para expressão em *E. coli*. A presença desses códons raros não atrapalhou completamente a expressão da *SmMTAP* em *E. coli*, uma vez que a proteína foi expressa satisfatoriamente (~ 15 mg de proteína/L de cultura). A presença das mutações pontuais e até mesmo da mutação dupla, não sobrecarregaram a expressão a ponto de interrompe-la, apesar de ser observado um baixo rendimento em relação à expressão da *SmMTAP* nativa. É possível que a presença de mais duas treoninas e uma leucina na sequência do mutante triplo, impossibilitaram a expressão e por isso a utilização da cepa Rosetta™, cepa essa que possui capacidade de expressar tRNAs para códons raros em *E. coli*, possibilitou a expressão satisfatória do mutante triplo.

Uma vez que se obteve expressão satisfatória para todos os mutantes, as proteínas foram então purificadas por cromatografia de afinidade, utilizando um único passo em coluna de cobalto (Co-NTA agarose, Quiagen). Cada passo da purificação foi acompanhado através da visualização da proteína em gel SDS PAGE (Figura 12). Os mutantes pontuais e duplo foram expressos de forma solúvel e, portanto, obteve-se sucesso na purificação. Já o mutante triplo, foi majoritariamente expresso de forma insolúvel, como pode ser visto na Figura 12-E. Estudos mostram que a expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* a partir de cepas que contem sequências codificadoras para tRNAs raros, possuem a solubilidade prejudicada, os autores sugerem que a presença dessas sequências, eliminam possíveis pausas na translação, aumentando a velocidade da tradução que faz com que a proteína não tenha um correto

enovelamento e, portanto, acaba se agregando. (58) Ainda na Figura 12-E, podemos ver que, apesar da maior parte do mutante 3M ter sido expresso de forma insolúvel, uma pequena parte encontrava-se na porção solúvel do lisado, sendo possível, apesar do baixo rendimento, a purificação da mesma.

Figura 12 - Gel SDS PAGEP da purificação das *SmMTAPs* mutadas. **A** – *SmMTAP-Q289L*, **B** – *SmMTAP-N87T* e **C** – *SmMTAP-S12T*: 1- Marcador de peso molecular; 2- Eluato; 3- Lavagem da coluna; 4 e 5- Frações da eluição. **D** – *SmMTAP-2M* e **E** – *SmMTAP-3M*: 1- Marcador de peso molecular; 2- *Pellet*; 3 - Eluato; 4- Lavagem da coluna; 5 e 6 - Frações da eluição. A seta vermelha, indica a banda referente à *SmMTAP-3M* insolúvel e a seta preta indica a banda referente à *SmMTAP-3M* solúvel. (~34,5 KDa).
 Fonte: Elaborada pela autora

3.2.2 Differential Scanning Fluometry (DSF)

Differential Scanning Fluometry (DSF), é uma técnica que vem sendo utilizada para detectar condições que estabilizam a proteína e assim predizer o grau de interação proteica com seus ligante e/ou inibidor.

A estabilidade de uma proteína está relacionada à energia livre de Gibbs ΔG_u , devido às contribuições entrópicas das forças de van der Waals que controla o estado enovelado da proteína. A estabilidade de muitas proteínas diminui com o aumento de temperatura, esse aumento faz com que ΔG_u diminua até chegar a zero no equilíbrio, onde a concentração de proteína enovelada e desenovelada é igual. Neste ponto, a temperatura é considerada como temperatura de *melting* (T_m). Se um composto se liga a proteína, a energia livre do composto ligado resulta em um aumento na ΔG_u , que causa um aumento na T_m . Assim, o efeito de estabilização de um composto é proporcional à T_m . (59)

Usando este princípio usamos a técnica de DSF para fazer uma avaliação rápida dos efeitos das mutações pontuais na estabilidade da *SmMTAP* na presença de MTA, ADN, PO_4 , 2dADN, 2FA e TBN. Como já citado na seção 3.1.2, inicialmente foi feito um teste que visou avaliar a melhor proporção de proteína versus fluoróforo, na qual obtinha-se o melhor sinal. O melhor sinal obtido foi usando 4 μM de proteína e SYPRO® Orange concentrado 5x.

A análise da estabilidade dos mutantes na presença de diferentes substratos foi feita em triplicata em um único ensaio, a fim de evitar variações de pipetagem. Cada mutante foi acompanhado de uma amostra referência, na qual continha apenas fluoróforo e a respectiva proteína. Foi calculada a variação da T_m (ΔT_m), subtraindo o valor da T_m da referência, do valor da T_m obtida para cada amostra. Em seguida a ΔT_m dos mutantes, para os diferentes substratos foi comparada com a ΔT_m da *SmMTAP* nativa. Para ambos os cálculos, utilizou-se o programa Excel (Microsoft) e foram considerados significativos valores de ΔT_m maiores que três vezes o desvio padrão dos valores de T_m da referência. (60) Inicialmente, analisamos a estabilidade dos mutantes em comparação à proteína nativa, sem a presença de qualquer ligantes (Figura 13), afim de avaliar o efeito de cada mutação na estabilidade da proteína.

Figura 13 - Variação de T_m dos mutantes em relação à SmMTAP nativa na ausência de ligantes.

Fonte: Elaborada pela autora

No gráfico da Figura 13, conclui-se que a substituição de uma asparagina (N) por uma treonina na posição 87 foi a única dentre as três substituições que praticamente não alterou a estabilidade da SmMTAP. Em contraste, a presença de uma leucina na posição 289 foi responsável por um grande aumento na estabilidade da SmMTAP ($\Delta T_m = 10,3$). A glutamina (Q) da posição 289 na SmMTAP, é um resíduo que interage com o sítio ativo da cadeia vizinha (31), essa interação não ocorre na HsMTAP (44) que, assim como o mutante, apresenta nessa posição uma leucina. Na ausência de ligantes no sítio ativo, é provável que a cadeia lateral da glutamina, que é altamente flexível, desestabilize a proteína na ausência de ligantes. Quando nessa posição está presente uma leucina, cuja cadeia lateral interage apenas com os resíduos da mesma cadeia, a proteína se torna mais estável.

Em seguida, comparamos a estabilidade da proteína nativa e de cada mutante na presença de diferentes substratos em relação às suas respectivas referências (Figura 14).

Figura 14 - ΔT_m obtidos no ensaio de DSF para a *SmMTAP* nativa e mutantes na presença de diferentes substratos em relação às respectivas amostras de referência. A linha tracejada indica o valor considerado significativo para variação de T_m .

Fonte: Elaborada pela autora

A análise dos valores do gráfico da Figura 14, mostra que para os substratos PO_4 e 2FA não houve variações significativas de ΔT_m ($> 1,8$). No entanto, na presença de PO_4 o mutante S12T foi o que mais se aproximou do valor considerado, apresentando $\Delta T_m = 1,3$, indicando que essa molécula apesar de pouco, foi capaz de estabilizar esse mutante. O resíduo da posição 12, é o principal resíduo na interação no sítio de ligação do fosfato (SLF) e a presença de uma T na posição 12 parece aumentar a força de interação entre a proteína e a molécula de PO_4 . Para o substrato 2-fluoroadenosina os resultados sugerem uma baixa interação entre a proteína e esse composto. É provável que a presença de um flúor ligado ao carbono 2 da base da 2FA impeça a ligação deste composto no sítio ativo e por isso não foi observada fortes interações nem mesmo entre os mutantes, uma vez que os resíduos substituídos não participam da interação com a base.

Os maiores valores de ΔT_m , foram observados para o composto TBN sendo o dobro dos observados para os substratos MTA e ADN, essa grande força na interação pode indicar, mesmo que de forma indireta, um efeito inibitório. A tubercidina é um análogo de adenosina, que já foi utilizado como agente anti-esquistossomose em macacos (61), entretanto, não é utilizada como quimioterápicos por apresenta alta toxicidade em células de mamíferos. A tubercidina é responsável pela separação dos vermes adultos em cópula e pela alteração do padrão de atividade muscular dos vermes diminuindo a capacidade de sucção da ventosa ventral,

reduzindo a motilidade e inibindo a postura de ovos. A tubercidina é apontada ainda, como bloqueadora da ação da adenosina fosforilase em *S. mansoni* inibindo a via de salvação de purinas (30), portanto, é provável que parte dos efeitos observados nos vermes com o uso da TBN sejam provavelmente causados pela inibição da SmMTAP revelando assim, mesmo que de forma indireta, a importância desta enzima, para as atividades funcionais do parasita.

Os mecanismos de toxicidade causados pela tubercidina nas células de mamíferos são bem compreendidos, a TBN é rapidamente convertida em nucleotídeo pela ação da Adenosina kinase, bloqueando a síntese de ácidos nucleicos. Em *S. mansoni*, também foram encontrados nucleotídeos mono, di e tri fosfatos sintetizados a partir de tubercidina marcada radioativamente, como o mecanismo de absorção da TBN é o mesmo que para a absorção de adenosina nas células, pensou-se que em *S. mansoni* a tubercidina poderia seguir a mesma rota metabólica que da adenosina, no entanto a tubercidina assim como outros análogos de adenosina, parecem não serem substratos para a adenosina fosforilase e, portanto, agem bloqueando esta enzima. (30)

Para analisar os efeitos das mutações sobre a interação dos mutantes com diferentes compostos, foi gerado um gráfico da diferença de ΔT_m de cada mutante em relação à ΔT_m da SmMTAP nativa na presença dos compostos correspondente (Figura 15).

Figura 15 - Gráfico da diferença de ΔT_m dos mutantes em relação à ΔT_m da SmMTAP nativa na presença de diferentes substratos. A linha tracejada indica o valor da variação de T_m considerado significativo para a análise.

Fonte: Elaborada pela autora

Através do gráfico da Figura 15, é possível concluir que a substituição de uma glutamina por uma leucina na posição 289 foi o fator mais impactante na estabilidade da *SmMTAP*, já que para essa substituição a proteína foi significativamente desestabilizada na presença de quase todos os compostos testados, com exceção apenas dos compostos PO_4 e 2FA. A baixa influência da substituição Q289L na ligação do substrato PO_4 já era esperada, uma vez que o resíduo desta posição não participa de interações no SLF. Já o composto 2-fluoroadenosina apresentou baixa influência na estabilidade proteica para todos os mutantes, incluindo a *SmMTAP* nativa (Figura 14). Ao contrário do que acontece com a proteína na ausência de ligantes (Figura 13), quando está presente qualquer composto contendo base e ribose, o resíduo Q289 atua estabilizando a proteína, o que não é visto quando está presente uma L289 (Figura 15). Isso acontece, provavelmente devido ao tamanho da cadeia lateral da leucina, que por não conseguir interagir no sítio ativo vizinho, compromete a estabilidade da proteína.

Entretanto, o que nos chama mais atenção é a grande participação do resíduo N87 na interação com adenosina, como pode ser visto no gráfico acima esse resíduo parece estar diretamente envolvido na especialização da *SmMTAP* em catalisar adenosina, já que a única substituição desse resíduo prejudicou amplamente a estabilização da proteína na presença somente de adenosina. Infelizmente não foi possível realizar os ensaios de DSF para o mutante 3M, de modo que não podemos afirmar se os resíduos N87 e Q289 atuam concomitantemente na ligação com adenosina, ou se atuam um compensando a ausência do outro, já que a estabilidade da proteína na presença de adenosina também foi prejudicada quando houve a substituição única do resíduo Q289.

3.2.3 Cinética enzimática da enzima *SmMTAP*

Além dos ensaios cinéticos para os mutantes da *SmMTAP*, foram também realizados novos ensaios para a *SmMTAP* nativa. Todos os ensaios foram baseados no método descrito por Buckoreelall, K. et al. (50) Foi realizada a determinação das constantes catalíticas para a fosforólise de MTA, adenosina, 2'-deoxiadenosina e fosfato e para a atividade com adenosina na ausência de fosfato. Também foi utilizado inosina, mas, no entanto, nenhuma atividade foi observada para esse substrato.

A constante de Michaelis-Menten (K_M), que é equivalente à concentração de substrato na qual a velocidade da reação é exatamente a metade da velocidade máxima ($V_{\max}$), indica a afinidade de uma enzima pelo seu substrato. A constante catalítica (k_{cat}), indica o número máximo de moléculas convertidas por unidade de tempo (*turnover number*) assim, k_{cat}/K_M

indicará a eficiência enzimática. (62) A análise desses parâmetros, para os mutantes da SmMTAP reforça os dados obtidos por DSF, de que as mutações aqui estudadas, modificam o modo de ligação do substrato e consequentemente interferem no mecanismo catalítico da enzima. Os dados cinéticos são apresentados separadamente para cada substrato.

3.2.3.1 Cinética enzimática para a fosforólise de MTA

As curvas de velocidade por concentração de MTA, podem ser visualizadas na Figura 16, e o valor dos parâmetros obtidos para a fosforólise de MTA são mostrados na Tabela 1.

continua

continuação

Figura 16 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de MTA pela *SmMTAP* nativa e mutantes.
Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 1 - Constantes catalíticas da *SmMTAP* nativa e mutantes para a fosforólise de MTA.

		$K_M (\mu M)$	$k_{cat} (s^{-1})$	$V_{max} (mM/s)$	$k_{cat}/K_M (\mu M^{-1}.s^{-1})$	R^2 ^
MTA	Nativa	$3,63 \pm 0,14$	$36,98 \pm 0,47$	0,005	$10,16 \pm 0,43$	0,98
	S12T	$1,22 \pm 0,09$	$12,09 \pm 0,37$	0,004	$9,86 \pm 0,81$	0,97
	N87T	$0,71 \pm 0,04$	$7,05 \pm 0,18$	0,002	$9,90 \pm 0,66$	0,98
	Q289L	$2,49 \pm 0,10$	$20,13 \pm 0,32$	0,006	$8,07 \pm 0,36$	0,99
	2M	$2,12 \pm 0,08$	$34,68 \pm 0,60$	0,003	$16,35 \pm 0,75$	0,99
	3M	$3,12 \pm 0,12$	$21,16 \pm 0,30$	0,002	$6,77 \pm 0,30$	0,99

^ Fração entre 0 e 1 que atesta a qualidade do modelo. Este parâmetro multiplicado por 100, indica a porcentagem de variância de Y que é explicada pela variância de X.
Fonte: Elaborada pela autora

Os parâmetros cinéticos obtidos para a fosforólise de MTA pela *SmMTAP* nativa estão de acordo com os obtidos anteriormente. (31) A *SmMTAP* possui 2x menos afinidade por MTA em comparação com a *HsMTAP* ($K_M = 1,8 \mu M$), mas ao contrário, possui aproximadamente 3x mais eficiência para esse substrato do que a *HsMTAP* ($k_{cat}/K_M = 3,2 \mu M^{-1}.s^{-1}$). (63) O mutante triplo, foi o que apresentou a menor eficiência ($6,77 \pm 0,3$), mas mesmo assim foi aproximadamente 2,1x maior do que a *HsMTAP*, indicando que outros fatores, além das três substituições, contribuem para a alta eficiência catalítica da *SmMTAP* por MTA. Devido ao

baixo valor de K_M da *HsMTAP*, esperava-se que o mutante triplo (que mais se assemelha à *MTAP* humana), apresentasse uma redução no valor desse parâmetro, mas ao contrário do que se esperava, o mutante triplo foi o que apresentou o maior valor de K_M em relação aos demais mutantes ($3,12 \pm 0,12$).

Dentre as substituições estudadas a presença de uma T87 é o fator que mais contribui para a ligação do MTA, já que o mutante N87T foi o que apresentou o menor valor de K_M para esse substrato ($0,71 \pm 0,04$), mas ao mesmo tempo a presença dessa T87 foi o fator que mais prejudicou a conversão de moléculas de MTA por unidade de tempo (*turnover number*) ($k_{cat} = 7,05 \pm 0,18$) comprometendo assim a eficiência catalítica. No entanto, essa brusca queda k_{cat} não foi observada nos mutantes duplo e triplo, indicando que a presença das demais substituições, compensam a presença da T87.

As demais substituições quando comparadas à *SmMTAP* nativa, todas reduziram o valor de K_M mostrando que as substituições facilitaram a ligação do MTA, mas, no entanto, a eficiência na catálise foi comprometida, já que o valor de k_{cat}/K_M foi reduzido para quase todos os mutantes com exceção apenas, do mutante duplo que apresentou, em relação a *SmMTAP* nativa, um leve aumento na eficiência catalítica (1,6x maior), mas que em comparação à *HsMTAP* apresentou um aumento significativo (5x maior). Portanto, pode-se dizer que a presença do resíduo Q289, é o fator que mais contribui para a eficiência catalítica na fosforólise do MTA na *SmMTAP*, pois quando esse resíduo foi substituído, foram registradas as maiores quedas na eficiência catalítica.

Durante os ensaios com MTA foi adicionado às reações concentrações que variaram de 10 a 200 μM de inosina, afim de verificar se esse nucleosídeo era capaz de inibir a reação, no entanto, nenhuma variação foi observada, o que indica que inosina não compete pelo sítio ativo da *SmMTAP*.

3.2.3.2 Cinética enzimática para a fosforólise de adenosina

As curvas de velocidade por concentração de adenosina, podem ser visualizadas na Figura 17, e o valor dos parâmetros obtidos para a fosforólise de ADN são mostrados na Tabela 2.

Figura 17 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de ADN pela *SmMTAP* nativa e mutantes.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 2 - Constantes catalíticas da SmMTAP nativa e mutantes para a fosforólise de ADN.

		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$V_{\text{máx}}$ (mM/s)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	R^2 [^]
Adenosina	Nativa	$3,14 \pm 0,16$	$27,84 \pm 0,57$	0,004	$8,85 \pm 0,51$	0,98
	S12T	$2,10 \pm 0,13$	$8,20 \pm 0,19$	0,003	$3,89 \pm 0,27$	0,97
	N87T	$3,30 \pm 0,21$	$5,20 \pm 0,12$	0,001	$1,51 \pm 0,11$	0,98
	Q289L	$1,81 \pm 0,08$	$7,98 \pm 0,14$	0,002	$4,40 \pm 0,23$	0,98
	2M	$3,68 \pm 0,14$	$25,74 \pm 0,37$	0,002	$6,99 \pm 0,29$	0,99
	3M	$7,35 \pm 0,36$	$23,36 \pm 0,42$	0,002	$3,17 \pm 0,17$	0,98

[^] Fração entre 0 e 1 que atesta a qualidade do modelo. Este parâmetro multiplicado por 100, indica a porcentagem de variância de Y que é explicada pela variância de X.

Fonte: Elaborada pela autora

Assim como para o MTA, os parâmetros cinéticos para o substrato adenosina também estão de acordo com os obtidos anteriormente. (31) Ao contrário do que acontece com MTA, a SmMTAP possui aproximadamente 60x mais afinidade por adenosina do que a HsMTAP ($K_M = 184 \mu\text{M}$) (63), esse dado revela a grande diferença existente entre a MTAP do parasita e do hospedeiro. A HsMTAP possui uma ampla preferência pelo substrato MTA, enquanto que a SmMTAP é muito bem adaptada para ambos os substratos (ADN e MTA) apresentando ligeira preferência por adenosina. Baixo valor de K_M para o substrato adenosina, não é exclusividade do parasita *S. mansoni*, na literatura os menores valores são descritos para *Sulfolobus solfataricus* ($K_M = 25 \mu\text{M}$) (63) e para *Plasmodium falciparum* ($K_M = 73 \mu\text{M}$) (64), mas ainda assim, para SmMTAP a afinidade por adenosina é de ~ 8x e 23x respectivamente, maior do que o apresentado para esses dois organismos, não deixando dúvidas de que a SmMTAP é a Adenosina fosforilase, descrita em 1975. (25-28) Infelizmente não há relatos sobre os valores de k_{cat} da HsMTAP para o substrato adenosina e por isso, não foi possível fazer uma comparação direta da eficiência catalítica para esse substrato entre SmMTAP e HsMTAP.

Ao contrário do que acontece para o substrato MTA, a presença de uma T87 parece ser um fator que compromete a ligação da adenosina uma vez que, os mutantes que nessa posição possuem uma asparagina (S12T e Q289L) apresentaram uma ligação facilitada com esse substrato.

3.2.3.3 Cinética enzimática para a fosforólise de 2'-deoxiadenosina

As curvas de velocidade por concentração de 2'-deoxiadenosina, podem ser visualizadas na Figura 18, e o valor dos parâmetros obtidos para a fosforólise de 2dADN são mostrados na Tabela 3.

Figura 18 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de 2dADN pela *SmMTAP* nativa e mutantes.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 3 - Constantes catalíticas da SmMTAP nativa e mutantes para a fosforólise de 2dADN.

2'deoxy adenosina		$K_M (\mu M)$	$k_{cat} (s^{-1})$	$V_{max} (mM/s)$	$k_{cat}/K_M (\mu M^{-1}.s^{-1})$	R^2^*
	Nativa	3.97 ± 0.41	18.69 ± 0.94	0.007	4.70 ± 0.55	0.98
	S12T	0.99 ± 0.09	4.30 ± 0.11	0.001	4.04 ± 0.39	0.96
	N87T	10.33 ± 0.78	36.76 ± 1.35	0.003	3.55 ± 0.30	0.98
	Q289L	3.02 ± 0.23	6.66 ± 0.19	0.002	2.20 ± 0.19	0.97
	2M	3.89 ± 0.16	31.06 ± 0.52	0.003	7.96 ± 0.37	0.98
	3M	6.52 ± 0.32	24.93 ± 0.44	0.002	3.82 ± 0.20	0.98

^{*} Fração entre 0 e 1 que atesta a qualidade do modelo. Este parâmetro multiplicado por 100, indica a porcentagem de variância de Y que é explicada pela variância de X.

Fonte: Elaborada pela autora

Apesar não haver valores de K_M disponíveis na literatura para 2dADN na MTAP humana, há descrito uma baixa atividade fosforolítica para esse substrato na HsMTAP oriunda da fração citosólica do fígado ($0,06 \pm 0,005 \mu M$ de adenina gerada por μmol de HsMTAP por hora). (65) Na SmMTAP, além de uma alta afinidade de ligação ($3,97 \pm 0,41$), o k_{cat} é de $18,69 s^{-1}$.

Para o substrato 2dADN, somente o mutante S12T possibilitou uma significativa melhora na ligação desse substrato (K_M 4x menor), em contrapartida os mutantes N87T e 3M, apresentaram piora em relação à SmMTAP nativa (K_M 2,6x e 1,6 x maior, respectivamente). O interessante, é que o mutante 2M, foi o único capaz de aumentar a eficiência catalítica em relação à SmMTAP nativa, mostrando que a presença concomitante de treoninas nas posições 12 e 87, atuam melhorando a eficiência catalítica na presença de uma Q289, mas não na ausência.

3.2.3.4 Cinética enzimática para o substrato PO_4

As curvas de velocidade por concentração de PO_4 , podem ser visualizadas na Figura 19, e o valor dos parâmetros obtidos para o uso do PO_4 como substrato são mostrados na Tabela 4.

Figura 19 - Ajuste de Michaelis-Menten para o substrato PO_4 pela *SmMTAP* nativa e mutantes.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 4 - Constantes catalíticas da SmMTAP nativa e mutantes para o substrato PO₄.

		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$V_{\text{máx}}$ (mM/s)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$)	$R^{2^{\wedge}}$
PO ₄	Nativa	65,58 ± 4,69	40 ± 0,62	0,002	0,60 ± 0,04	0,98
	S12T	10370 ± 998	9,67 ± 0,44	0,003	0,001 ± 0	0,97
	N87T	42,35 ± 4,84	31,44 ± 0,84	0,010	0,74 ± 0,09	0,93
	Q289L	288 ± 23	4,21 ± 0,14	0,001	0,015 ± 0	0,97
	2M	143 ± 7	43,68 ± 0,68	0,004	0,30 ± 0,02	0,98
	3M	435 ± 41	1,06 ± 0,03	0,000	0,002 ± 0	0,96

[^] Fração entre 0 e 1 que atesta a qualidade do modelo. Este parâmetro multiplicado por 100, indica a porcentagem de variância de Y que é explicada pela variância de X.

Fonte: Elaborada pela autora

Para o substrato PO₄, a SmMTAP apresenta um K_M aproximadamente 5x menor do que é visto para a HsMTAP (320 μM) (66), indicando uma maior eficiência na ligação do PO₄. Os mutantes Q289L e 3M aumentaram o valor de K_M em ~ 4,3 e 6,6x respectivamente, em relação à nativa se aproximando ao K_M da HsMTAP. O mais intrigante ocorre para as mutações no SLF (S12T e N87T), o mutante S12T mostrou um aumento de 158x no valor de K_M e redução de 600x no valor de k_{cat}/K_M em relação à forma nativa, enquanto o mutante N87T não apresenta grande variação. Quando estão presentes ambas mutações (mutante 2M) o K_M aumenta apenas 2x e o k_{cat}/K_M reduz apenas 0,5x. Esses dados foram compreendidos após a obtenção dos dados cristalográficos (que serão discutidos na seção 3.2.8.3), que revelaram que na presença de uma T12, a flexibilidade do *loop* do fosfato diminui, prejudicando a ligação e a catálise, mas que, entretanto, quando está presente uma T87 surge uma nova interação com o PO₄, antes inexistente, que compensa o fator prejudicial causado pela presença da T12. Estes diferentes modos de interações refletiram de forma direta no processo de ligação e utilização do PO₄ e explicam os valores discrepantes obtidos na cinética.

O resíduo Q289 se mostrou extremamente importante para a catálise mesmo estando no sítio de ligação da ribose (SLR), pois sua ausência no mutante triplo, reduziu 150x o valor de k_{cat}/K_M em relação ao duplo mutante. O efeito da presença de uma T87 na ausência do Q289 (mutante 3M), embora menor, também ameniza os efeitos prejudiciais da T12 (vide k_{cat}/K_M do mutante triplo em relação ao mutante S12T) em contrapartida, a presença isolada do Q289 na ausência da T87 (mutante S12T), não é suficiente para melhorar a catálise. Infelizmente não dispomos de um mutante duplo para as substituições S12T/Q289L e, portanto, não pudemos mensurar a intensidade com que a T89 atuaria na ausência da Q289 quando estivesse presente uma T12.

Um fato de extrema relevância, foi observado durante a determinação dos parâmetros cinéticos para PO_4 da *SmMTAP* nativa. Mesmo com concentrações ínfimas de PO_4 , foi observado uma alta e contínua atividade catalítica para adenosina. Suspeitou-se assim, da capacidade da *SmMTAP* catalisar adenosina na ausência de fosfato (Figura 20).

Figura 20 - Gráfico da velocidade versus concentração de PO_4 . Velocidade relativamente constante mesmo à baixas concentrações de PO_4 ($V_0 \sim 31,9 \text{ nm/min}$).
Fonte: Elaborada pela autora

Na década de 70, quando foi relatada a atividade da adenosina fosforilase na via de salvação de purinas em *S. mansoni*, estudos já apontavam para a possibilidade desta enzima ser capaz de hidrolisar adenosina. Usando extrato de verme adulto, os autores detectaram adenina a partir de adenosina marcada radioativamente na ausência de fosfato. A rápida formação da base marcada radioativamente, fez com que os autores descartassem a formação de adenina pela via $\text{AK} \rightarrow \text{APRT}$ (Figura 6), sugerindo uma atividade hidrolítica para a adenosina fosforilase, que era até então desconhecida. (27)

3.2.3.5 Cinética enzimática para Adenosina na ausência de fosfato

Para os ensaios cinéticos na ausência de fosfato, a *SmMTAP* e seus mutantes foram exaustivamente dialisados contra tampão HEPES antes do início dos experimentos. Foram determinados os parâmetros cinéticos para adenosina, mas infelizmente não foi possível realizar ensaios usando MTA como substrato, portanto, não sabemos se a *SmMTAP* apresenta atividade também para esse substrato na ausência de fosfato. Os mutantes Q289L e S12T não apresentaram atividade para adenosina na ausência do fosfato. As curvas de velocidade por concentração de adenosina, podem ser visualizadas na Figura 21, e o valor dos parâmetros obtidos para a conversão de adenosina na ausência de fosfato são mostrados na Tabela 5.

Figura 21 - Ajuste de Michaelis-Menten para adenosina na ausência de fosfato pela SmMTAP nativa e os mutantes N87T, 2M e 3M.

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 5 - Constantes catalíticas da SmMTAP nativa e mutantes para adenosina na ausência de fosfato.

		K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$V_{\text{máx}}$ (mM/s)	k_{cat}/K_M ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	R^2
Adenosine sem PO_4	Nativa	$4,60 \pm 0,39$	$14,66 \pm 0,32$	0,001	$3,15 \pm 0,28$	0,96
	S12T	Não catalisa				
	N87T	$8,86 \pm 0,52$	$51,35 \pm 1,05$	0,0004	$5,79 \pm 0,36$	0,98
	Q289L	Não catalisa				
	2M	$38,74 \pm 4,19$	$13,37 \pm 0,69$	0,001	$0,34 \pm 0,04$	0,96
	3M	$17,39 \pm 1,36$	$10,99 \pm 0,33$	0,001	$0,63 \pm 0,05$	0,97

[^] Fração entre 0 e 1 que atesta a qualidade do modelo. Este parâmetro multiplicado por 100, indica a porcentagem de variância de Y que é explicada pela variância de X.

Fonte: Elaborada pela autora

A *SmMTAP*, se apresentou bem adaptada em catalisar adenosina na ausência de fosfato, para a forma nativa houve aumento de apenas 1,4x no valor de K_M , e reduções de apenas 1,8 e 2,8x de k_{cat} e k_{cat}/K_M respectivamente. O mutante que apresentou maior piora foi o duplo mutante, que teve aumento de K_M de 10,5x e redução de k_{cat}/K_M de 13x.

Um fato interessante, é que na ausência de fosfato, ao contrário do que acontece na fosforólise (Tabela 2), a presença do resíduo T87 (mutante N87T) melhora a eficiência catalítica, proporcionando um aumento de 1,8x no valor de k_{cat}/K_M . No entanto, o duplo mutante, além de apresentar o maior aumento de K_M (8,4x), apresentou também grande queda no k_{cat}/K_M , 9,2x menor. Esses dados mostram que o resíduo S12 é um dos grandes responsáveis pela adaptação da *SmMTAP* em catalisar na ausência do fosfato. Apesar dos resíduos serina e treonina, serem ambos resíduos polares neutros, a substituição S12T impediu a capacidade catalítica na ausência de fosfato da *SmMTAP* e reverteu a melhora causada pela T87 no duplo mutante. O resíduo Q289 é sem dúvida um resíduo que também contribui grandemente para essa adaptação, já que não houve catálise na sua ausência, porém parece exercer um efeito menor em comparação à S12, uma vez que no triplo mutante a ausência do Q289 fez com que o k_{cat} fosse apenas 1,2x menor que o obtido para o duplo mutante, essa leve queda do k_{cat} , no entanto, foi compensada pela melhora do K_M (2,2x menor) resultando em um $k_{cat}/K_M \sim 2x$ maior para o triplo mutante.

A catálise de nucleosídeos por nucleosídeo fosforilases na ausência de fosfato foi observada também para uridina fosforilase em bovinos, onde a enzima produziu a base livre através da formação de um glicol na presença de sulfato (67), e para purina nucleosídeo fosforilases do baço de bezerros que mostrou-se capaz de hidrolisar Inosina, guanosina e 7-metilguanosina na ausência de fosfato, através do ataque lento de moléculas de água. (68-69)

3.2.4 Cristalização e co-cristalização dos mutantes da *SmMTAP*

Os mutantes da *SmMTAP* foram submetidos à ensaios manuais de cristalização e co-cristalização a uma concentração de 5 mg/mL. Com exceção do mutante triplo (3M), os demais mutantes cristalizaram em aproximadamente 3 dias após a montagem das gotas e em uma semana atingiram sua maior dimensão. Os cristais obtidos foram crio-protegidos e enviados ao DLS para posteriormente serem submetidos à difração de raios X. Na Figura 22 são observados os cristais das *SmMTAP* mutadas já no *loop* e com o feixe de raios X alinhado para disparo.

Figura 22 - Cristais dos mutantes da *SmMTAP* no *loop* já alinhado para disparo dos raios X. A – *SmMTAP*-S12T; B – *SmMTAP*-N87T; C – *SmMTAP*-Q289L e D – *SmMTAP*-2M.

Fonte: Elaborada pela autora

Como não foram obtidos cristais para o mutante 3M, esse mutante foi submetido à um *screening* de soluções de cristalização utilizando os Kits Morpheus® HT (70) e Index HT™ e o robô de cristalização Honeybee (Genomic Solutions), usando a técnica de difusão de vapor em “gotas sentadas”, no entanto, não foi obtido qualquer cristal desse mutante.

3.2.5 Coleta e processamento dos dados de difração de raios X

Todos os cristais crio protegidos e enviados para coleta de dados no DLS, foram submetidos a difração de raios X nas linhas I02 e I04-1. Foram coletados mais de 100 conjuntos de dados para os mutantes da *SmMTAP*. Para otimizar a análise desse volume de dados, foi utilizado o programa DIMPLE (Difference Map PipeLine), um programa desenvolvido no DLS, que permite uma avaliação rápida dos dados, checando se existe densidade eletrônica na cavidade do sítio ativo, desta forma foi possível analisar a presença ou não de ligantes, antes de proceder com o refinamento dos dados. Dentre os mais de 100 conjuntos de dados, todas as estruturas dos mutantes cristalizaram no sistema cristalino monoclinico com grupo espacial $P2_1$. Para *SmMTAP* nativa é descrita uma única estrutura com grupo espacial $P2_12_12_1$ (31) O conteúdo da unidade assimétrica foi estimado pelo Coeficiente de Matthews, obteve-se estruturas contendo um ou dois trimeros na unidade assimétrica. O refinamento foi feito utilizando o programa Phenix (54), a visualização dos mapas de densidade eletrônica e a construção dos modelos foram feitos no programa COOT (55), os valores de R e R_{free} são descritos na seção 3.2.6. Foram validadas 9 estruturas inéditas, sendo três para o mutante S12T, dois para o mutante N87T, dois para o mutante Q289L e dois para o mutante 2M. O fator de estrutura e as coordenadas das estruturas resolvidas e validadas foram depositados no banco de

dados PDB (*Protein Data Bank*) (Tabela 6). A estatística completa da coleta dos dados pode ser consultada no Anexo A.

Tabela 6 - Estruturas obtidas para os mutantes da *SmMTAP*.

Mutantes	Complexo	Resolução (Å)	Código PDB
S12T	APO	2,06	5F73
	ADN	2,02	5F77
	MTA	1,95	5F76
N87T	APO	1,85	5F78
	ADN	1,66	5F7J
Q289L	ADN	1,81	5F7O
	TBN	1,77	5F7X
2M	APO	1,80	5F7Z
	ADN	1,97	5FAK

Fonte: Elaborada pela autora

3.2.6 Validação dos modelos

Após completo o refinamento dos dados, os modelos foram avaliados e validados utilizando-se 2 métodos: avaliação do valor do R e R_{free} (56) e validação pelo programa MolProbity. (57) Durante o processo de refinamento procura-se encontrar uma concordância entre o modelo proposto e a estrutura real. Antes do primeiro passo deste processo, aproximadamente 5% das reflexões são separadas do refinamento e utilizadas como um conjunto de teste no cálculo do fator R_{free} , as demais reflexões seguem para o refinamento e geram o fator R. Ambos os valores melhoram (diminuem) à medida que o modelo se torna mais completo e mais parâmetros como, ângulos de ligação, distancias, torsões, quiralidade e interações são ajustados. Num certo estágio do refinamento, o modelo será ideal, e a introdução de mais parâmetros não melhorará o modelo. Neste ponto, o R_{free} para de diminuir, e o R é reduzido artificialmente, assim a validação do modelo por este método é feita através da observação dos valores de R_{free} (o melhor modelo será o de menor valor de R_{free}) e pelo intervalo entre os valores de R_{free} e R. Para estruturas proteicas resolvidas à resolução melhor que 2,0 Å, espera-se que o R atinja valores menores que 0,2 e a diferença entre eles, seja em torno de 0,05. (71) Abaixo na (Tabela 7), são mostrados os valores de R obtidos para as nove estruturas inéditas. Os valores são coerentes e considerados bons em relação ao valor da resolução obtida.

Tabela 7 - Valores de R_{free} e R das nove estruturas obtidas.

	R	R_{free}	Resolução (Å)
<i>SmMTAP-S12T-APO</i>	0,175	0,216	2,06
<i>SmMTAP-S12T-ADN</i>	0,169	0,215	2,02
<i>SmMTAP-S12T-MTA</i>	0,166	0,194	1,95
<i>SmMTAP-N87T-APO</i>	0,171	0,199	1,85
<i>SmMTAP-N87T-ADN</i>	0,194	0,226	1,66
<i>SmMTAP-Q289L-ADN</i>	0,182	0,211	1,81
<i>SmMTAP-Q289L-TBN</i>	0,163	0,192	1,77
<i>SmMTAP-2M-APO</i>	0,210	0,235	1,80
<i>SmMTAP-2M-ADN</i>	0,181	0,214	1,97

Fonte: Elaborada pela autora

Um outro método de validação utilizado, foi a análise dos contatos atômicos, utilizando o programa MolProbity, que fornece uma análise detalhada de todos os contatos entre os átomos e detecta problemas estéricos no interior das moléculas através do cálculo das ligações de hidrogênio e contatos de van der Waals nas interfaces entre os componentes. O programa também faz a análise do desvio do carbono- β em relação à cadeia central (um sinal de que a torção da cadeia lateral subsequente talvez esteja errada). (71-72) Outra ferramenta do MolProbity, é a análise do gráfico de Ramachandran (73), esse gráfico cruza os valores dos ângulos ϕ e ψ e permite uma verificação detalhada da estereoquímica da estrutura proteica através da análise gráfica dos ângulos e torções da cadeia principal e laterais. Os ângulos ϕ e ψ apresentam combinações preferenciais de seus valores, com base na conformação e na menor energia de ligação dos resíduos. Desvios na conformação preferencial dos resíduos são usados para indicar possíveis erros na estrutura, mas não significam necessariamente erros estrutural, por isso os resíduos que apresentam esses desvios (*outliers*), devem ser checados um a um. (74) Os dados gerados por todas as análises do MolProbity podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise das estruturas dos mutantes da *SmMTAP* gerada pelo programa MolProbity

Parâmetros Analisados	S12T APO	S12T ADE	S12T MTA	N87T APO	N87T ADN	Q289L ADN	Q289L TBN	2M APO	2M ADN	Ref
MolProbity score ¹	1,16	1,07	1,16	1,16	1,03	1,42	1,06	1,17	1,08	-
Clashscore ²	1,97	2,82	1,51	3,08	2,37	4,09	2,07	3,11	2,94	-
Rotâmeros Ruins (%)	1,82	0,70	2,23	1,20	1,05	2,01	1,28	1,24	0,43	< 0,3%
Ramachandran outliers (%)	0,12	0,00	0,00	0,00	0,06	0,12	0,24	0,00	0,00	< 0,05%
Desvio C β > 0,25 ^a (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Res. com ligações ruins (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0%
Res. com ângulos ruins (%)	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00	0,01	0,01	< 0,1%

¹ MolProbity score: combina o valor do clashscore, rotâmeros e as avaliações do Ramachandran em uma única pontuação, normalizada para estar na mesma escala que a resolução dos dados de raios X.

² Clashscore: é o número de sobreposições ruins graves (> 0,4 Å) para cada 1000 átomos.

Fonte: Elaborada pela autora

Os dados apresentados, com exceção dos rotâmeros, estão dentro do referencial proposto pelo programa, sendo que os demais diferem minimamente do referencial. Os resíduos que apresentaram desvio na conformação preferencial foram checados e não apresentaram erros estruturais. Assim os padrões analisados pelo MolProbity foram considerados ideais e, portanto, as estruturas foram validadas para análise.

3.2.7 Análise estrutural da *SmMTAP* nativa e mutantes

Além das mutações, a diferença entre as estruturas consiste apenas na presença ou não de ligantes, que interagem no sítio ativo de forma diferente dependendo de qual mutação está presente. Além da confirmação por sequenciamento a presença das mutações S12T, N87T, Q289L e S12T/N87T pôde também ser confirmada pela análise dos mapas de densidade eletrônica. Na Figura 23 é possível ver os mapas de densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3.0 σ , para as mutações S12T, N87T e Q289L.

Figura 23 - Mapa da densidade eletrônica Fo-Fc contornado a 3.0σ , para as mutações, **A**-S12T, **B**- Q289L e **C**- N87T.
 Fonte: Elaborada pela autora

O enovelamento dos mutantes da *SmMTAP*, assim como da *SmMTAP* nativa, consiste de um barril distorcido central contornado por α -hélices (Figura 24-A). Foi feita a análise de todas as estruturas resolvidas juntamente com as estruturas da *SmMTAP* nativa (*SmMTAP*-APO 4L5Y; *SmMTAP*-ADE 4L6I; *SmMTAP*-TBN 4L5A e *SmMTAP*-ADE-P2₁2₁2₁ 4L5C), que juntas somam a análise de 66 monômeros de 22 trímeros independentes oriundos de 13 estruturas diferentes (Figura 24-B). Os trímeros e monômeros são similares com RMSD (*Root mean square deviation*) médio de 0,23 e 0,22 Å, respectivamente.

Figura 24 - A. Estrutura trimérica do mutante N87T da *Sm*MTAP em esquema de cartoon (fitas beta em azul, hélices em rosa).
B. Sobreposição dos 66 monômeros dos 22 trímeros das 13 diferentes estruturas analisadas da *Sm*MTAP.
Fonte: Elaborada pela autora

Em 23 dos 66 monômeros analisados, foi claramente observada uma densidade eletrônica para adenina, no sítio ativo dos mutantes S12T, N87T, Q289L, 2M e nativa (Figura 25). Essas estruturas eram oriundas de cristais co-cristalizados com MTA ou adenosina, e quando não apresentavam adenina no sítio, estavam na forma apoenzima. A presença de moléculas de adenina nas estruturas dos mutantes N87T, 2M e nativa, são devido ao fato da *Sm*MTAP possuir a capacidade de catalisar na ausência de fosfato, uma vez que foi usado propositalmente, sulfato para ocupar o SLF inibindo assim a fosforólise desses substratos. O mutante S12T e Q289L, como visto nos ensaios cinéticos, não possuem capacidade catalítica na ausência de fosfato e, portanto, a molécula de adenina é provavelmente proveniente do metabolismo bacteriano. O fato do mutante S12T não possuir capacidade catalítica na ausência do fosfato, possibilitou a obtenção do complexo S12T-MTA, sendo que essa é a primeira estrutura de *Sm*MTAP com MTA no sítio ativo descrita para *S. mansoni* (Figura 26).

Figura 25 - Mapa de densidade Fo-Fc contornado a 3.0 σ para a molécula de adenina no sítio ativo do mutante S12T da *Sm*MTAP.

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 26 - Mapa de densidade Fo-Fc contornado a 3.0 σ para a molécula de MTA no sítio ativo do mutante S12T da *Sm*MTAP.

Fonte: Elaborada pela autora

Além dos complexos com MTA e adenina, foi obtido também um complexo com tubercidina para o mutante Q289L (Figura 27).

Figura 27 - Mapa de densidade Fo-Fc contornado a 3.0 σ para a molécula de tubercidina no sítio ativo do mutante Q289L da *Sm*MTAP.

Fonte: Elaborada pela autora

A sobreposição das estruturas, revelaram grandes movimentos em determinadas partes da proteína. As regiões compreendidas entre os resíduos 9-21 (*phosphate loop*) e entre os resíduos 119-128, 158-169 e 229-254 (*gate loop*), são as regiões mais flexíveis e sofrem grandes mudanças conformacionais induzidas pela presença do ligante (Figura 28).

Figura 28 - Imagem do movimento do *gate loop* (resíduos 231-242) induzido pela presença da adenina no sítio ativo. Sobreposição da estrutura em complexo com adenina (em vermelho) e da estrutura na forma apoenzima (em azul). O principal resíduo do sítio ativo é o D230 (em amarelo), na estrutura APO, o resíduo D230 aponta para fora do sítio, a presença da base é o fator necessário para o “fechamento” do *gate loop* na conformação de interação.

Fonte: Elaborada pela autora

Em 20 dos 23 monômeros em complexo com adenina, o *gate loop* está na conformação fechada, o que indica que as subunidades sem adenina, assumem preferencialmente a conformação aberta do *gate loop*, e fazem com que o principal resíduo catalítico (D230), aponte sua cadeia lateral para fora do sítio. A presença da base induz a conformação fechada do *gate loop* fazendo com que com a cadeia lateral do resíduo D230 esteja voltada para a base. Entretanto, é interessante dizer que 3 monômeros (cadeia E do mutante 2M, cadeias B e C do mutante S12T) assumiram a conformação aberta do *gate loop*, mesmo com uma adenina ligada no sítio ativo.

Na estrutura APO dos mutantes S12T, N87T e 2M, foi claramente observada, densidade eletrônica para pontes dissulfeto (SS) entre os resíduos C233 e C242 (Figura 29). O resíduo C242 é substituído por uma S232 na *HsMTAP*, que por sua vez, não apresenta ligações do tipo SS. A presença dessas pontes dissulfeto, foi um fato inesperado, já que em nenhuma estrutura nativa foi observada ligações deste tipo.

Figura 29 - A. Mapa de omissão composto contornado a 1σ da região que contém a ligação SS na *Sm*MTAP. B. Mesma região mostrada em A, sem a presença do mapa de densidade eletrônica. A ligação SS, é formada pelos resíduos C233 e C242 e aparecem somente em algumas estruturas APO de mutantes.

Fonte: Elaborada pela autora

A principal consequência da formação da ponte de dissulfeto entre os resíduos C233 e C242, é o travamento do *gate loop* na conformação aberta, que provavelmente está relacionado com a acessibilidade do ligante ao sítio ativo. Um dado interessante, é que somente as estruturas contendo a ligação SS apresentaram a região do *gate loop* de forma ordenada e com clara densidade eletrônica para os resíduos C233 e C242. De forma geral, a região entre os resíduos 229-242, que compreende o resíduo catalítico D230 e o *gate loop*, são desordenadas nos monômeros que não contém ligante no sítio ativo, reforçando a ideia de movimento do *gate loop*.

3.2.8 Sítio ativo da *Sm*MTAP nativa e mutantes

Como em outras MTAPs, o sítio ativo está localizado próximo a interface entre os monômeros, com participação dos resíduos H131 e Q289 da subunidade vizinha, as interações mediadas por ligações de hidrogênio e por contatos hidrofóbicos para todos os ligantes encontrados no sítio ativo, podem ser visualizadas no diagrama LigPlot⁺ (75) da Figura 30. O sítio ativo é dividido em três subsítios: Sítio de ligação do fosfato (SLF), sítio de ligação da base (SLB) e sítio de ligação da Ribose/metiltioribose (SLR) assim como é descrito para as NPs.

Figura 30 - Diagrama LigPlot⁺ para as interações do ligante no sítio ativo da SmMTAP. **A.** Adenina; **B.** PO₄/SO₄; **C.** Tubercidina; **D.** MTA. Ligações de hidrogênio estão representadas por linhas tracejadas entre os átomos envolvidos, contatos hidrofóbicos estão representados por um arco com raios que irradiam para os átomos em contato.

Fonte: Elaborada pela autora

3.2.8.1 Sítio de Ligação da Base (SLB)

Apesar dos resíduos do SLB serem totalmente conservados entre a *Sm*MTAP e *Hs*MTAP, as propriedades cinéticas são totalmente diferentes, como já discutido. No sítio de ligação da base, a molécula de adenina ou a porção referente à adenina do MTA, forma 2 ligações de hidrogênio com o resíduo D230, 1 com o resíduo D232 e 2 com uma molécula de água que fica ancorada pela cadeia lateral dos resíduos D232 e S188 (Figura 31).

Figura 31 - Sítio de ligação da base da *Sm*MTAP ocupado por uma molécula de adenina e uma de sulfato. Em branco, resíduos da cadeia B; em azul, resíduo da cadeia A; em verde, adenina; em amarelo, sulfato; Asteriscos em vermelho, representam moléculas de água.

Fonte: Elaborada pela autora

Como já foi mencionado, nas cadeias B e C e E dos mutantes S12T e 2M, respectivamente, a presença da base não induziu o fechamento do *gate loop*, mas apesar disso, o resíduo D230 aponta para a base em vez de apontar para fora do sítio, como pode ser observado na Figura 32.

Figura 32 - Sobreposição das estruturas, em complexo com adenina (em vermelho), na forma apoenzima (em azul) e da cadeia C do mutante S12T-ADN (em rosa). No mutante S12T, mesmo o sítio estando ocupado pela base, o *gate loop* está na conformação aberta acompanhando a estrutura APO, no entanto, a cadeia lateral do resíduo D230 permanece voltada para dentro do sítio, acompanhando a estrutura em complexo com adenina que possui o *gate loop* fechado. Há uma quebra de cadeia entre os resíduos K235 e V243 no mutante S12T, indicando que esta região é altamente flexível.

Fonte: Elaborada pela autora

Foram analisados 9 monômeros em complexo com tubercidina (2 trímeros para SmMTAP nativa e 1 para o mutante Q289L). Dos monômeros analisados, 4 da SmMTAP nativa e 1 do mutante Q289L, mesmo tendo o sítio ocupado, apresentam o *gate loop* na conformação aberta, com a cadeia lateral do resíduo D230 apontando para fora do sítio (Figura 33-A), ou seja, a presença da tubercidina não induz o fechamento do *gate loop*. Nos demais monômeros, o *gate loop* se apresenta na conformação fechada e o resíduo D230 interagindo com a base 7-deaza-adenina da TBN, mas, no entanto, as interações com a base nesse caso, não são como as observadas para adenina. A presença do nitrogênio na posição N7 parece ser o fator necessário para orientar a cadeia lateral do resíduo D230. Em apenas um dos monômeros do mutante Q289L (Cadeia A) em complexo com tubercidina, o resíduo D230 permanece com a cadeia lateral voltada para a base, apesar disso, uma das interações entre o átomo N6 e a molécula de água, cuja posição no sítio ativo é conservada é desfeita (Figura 33-B).

No complexo com MTA, as cadeias A e B apresentaram o *gate loop* na conformação fechada e apenas a cadeia C na conformação aberta. A base do MTA, interage exatamente como é observado nas estruturas em complexo com adenina Figura 33-C.

Figura 33 - Ligação de tubercidina e MTA no SLB. **A.** Tubercidina no SLB na *Sm*MTAP nativa, *gate loop* na conformação fechada com a cadeia lateral do resíduo D230 apontando para fora do sítio **B.** Tubercidina no SLB na cadeia A do mutante Q289L, *gate loop* na conformação fechada com a cadeia lateral do resíduo D230 na conformação clássica, interagindo com a 7-deaza-adenina, mas com a perda de uma interação do átomo N6. **C.** Molécula de MTA no sítio ativo do mutante S12T. Resíduos 118, 229-232 mostrados em modelo de bastão.

Fonte: Elaborada pela autora

A comparação do SLB entre as estruturas em complexo e na forma apoenzima, revelaram um grande movimento estrutural que envolve principalmente os resíduos 230-232. De forma geral, nas estruturas APO os resíduos 233-241 estão ausentes, devido à esse movimento. Este movimento não foi observado para MTAPs de outros organismos.

3.2.8.2 Sítio de Ligação da Ribose/Metiltioribose (SLR)

A caracterização do SLR, foi baseada na análise das estruturas em complexo com MTA (3 monômeros do mutante S12T) e em complexo com tubercidina (9 monômeros, sendo 6 da proteína nativa e 3 do mutante Q289L). A única diferença da tubercidina em relação à adenosina é a substituição de um átomo de nitrogênio por um de carbono na posição 7 da base, portanto, as observações feitas para a porção ribose da tubercidina, podem ser estendidas à porção ribose da adenosina.

Na maioria dos monômeros analisados para a *Sm*MTAP nativa, a porção ribose da tubercidina, forma 4 ligações com SLR, uma entre a ribose e o resíduo N205 (Asn205/ND2-TBN/O2'), uma com o resíduo M206 (Met206/N-TBN/O2') e duas com o resíduo Q289 (Gln289/OE1-TBN/O5' e Gln289/NE2-TBN/O5') da cadeia vizinha. A ribose faz ainda quatro interações com a molécula de SO₄/PO₄ (SO₄/O1-TBN/O2', SO₄/O1-TBN/O3', SO₄/O4-TBN/O3' e SO₄/O4-TBN/O4'), e uma com uma molécula de água presente no sítio (HOH105/O-TBNO3') (Figura 34-A).

Em alguns monômeros, foi observada uma mudança conformacional da cadeia lateral do resíduo N205, que é desviada 1,3 Å para longe da ribose, fazendo com que a interação entre a ribose e este resíduo seja desfeita. Nesta conformação, o átomo O2' da ribose passa a interagir com o átomo O do resíduo A88. A molécula de água deixa o sítio, e o contato do O3' da ribose passa a ser feito com o átomo O1 da molécula de sulfato/fosfato. Com essa nova configuração, é desfeita a interação entre o átomo OE1 do resíduo Q289 e o O5' da ribose (Figura 34-B).

Figura 34 – Modo de interação da porção ribose da tubercidina no SLR na *SmMTAP* nativa. **A.** Modo de interação envolvendo o resíduo N205; **B.** Modo de interação que não envolve o resíduo N205. Em branco, resíduos da cadeia A; em azul, resíduo da cadeia C; em verde, porção ribose da tubercidina; em amarelo, molécula de sulfato/fosfato.
Fonte: Elaborada pela autora

Appleby et al. (44) relatam que a especificidade da *HsMTAP* por MTA ou por outros 5'-deoxinucleosídeos, parece ser uma consequência da hidrofobicidade e ausência de interações no SLR. Aparentemente, as várias interações descritas acima, só são possíveis devido a presença do resíduo Q289 da subunidade vizinha, uma vez que a *HsMTAP* (que possui a substituição Q289L279) e o mutante Q289L apresentam somente uma interação da porção ribose com o SLR (Met206/N-TBN/O2'). O tamanho menor da cadeia lateral da leucina, contribui para a não formação de qualquer interação entre a ribose e a cadeia lateral de resíduos da subunidade vizinha (Figura 35), no entanto, é interessante citar que as PNPs bovina e humana (pdb 1A9S e 1RCT, respectivamente), que não catalisam adenosina, apresentam uma interação entre o O5' da ribose e a cadeia lateral do resíduo H257 muito similar à que é vista na *SmMTAP* e, portanto, essa ligação, apesar de ser um fator facilitador na interação, não pode ser apontado como um fator determinante na especialização da *SmMTAP* em catalisar adenosina.

Figura 35 – Modo de interação da porção ribose da tubercidina no SLR no mutante Q289L da *S*mtAP. A presença de uma leucina na posição 289 da cadeia C impede a interação dessa subunidade com o SLR da cadeia A, provavelmente esse é o fator que possibilita somente uma interação da porção ribose com o SLR. Em branco, resíduos da cadeia A; em azul, resíduo da cadeia C; em verde, porção ribose da tubercidina; em amarelo, molécula de sulfato/fosfato. Fonte: Elaborada pela autora

Os dados estruturais, corroboram com os dados cinéticos já discutidos na seção 3.2.3. Juntos, esses dados mostram que a presença da L289 facilita a entrada dos substratos no SLR (redução do valor de K_M de aproximadamente 1,5x para os substratos ADN, MTA e 2dADN), mas, no entanto, a perda da interação com o resíduo da posição 289, prejudica a atividade enzimática, fazendo com que a eficiência catalítica seja reduzida em 2, 1,26 e 2,1x para os substratos ADN, MTA e 2dAND, respectivamente.

Quando uma molécula de MTA está no SLR, apenas o O2' interage com o sítio catalítico, somente esse átomo faz três interações, sendo 1 com o resíduo M206 (Met206/N-MTA/O2'), 1 com o resíduo N295 (Asn205/ND2-MTA/O2') e uma última com o resíduo A88 (Ala88/O-MTA/O2'). Devido a presença do grupo metiltio na posição 5', a interação com o resíduo Q289 não acontece, uma vez que a cadeia lateral desse resíduo sofre um deslocamento a fim de acomodar o grupo volumoso (Figura 36). Não são observadas, outras diferenças significativas nesta interação.

Figura 36 – Modo de interação da molécula de MTA no SLR no mutante S12T da *SmMTAP*. Em branco, resíduos da cadeia A; em azul, resíduo da cadeia C; em verde, MTA; em amarelo, molécula de sulfato/fosfato.

Fonte: Elaborada pela autora

3.2.8.3 Sítio de Ligação da Fosfato (SLF)

O sítio de ligação do fosfato foi caracterizado pela presença de uma molécula de sulfato. O SLF é composto pelos resíduos S12, R54, H55, A88 e T207, sendo a A88 o principal resíduo na interação. O ambiente químico proporcionado pela presença da cadeia lateral desses resíduos facilita a ligação dos íons carregados negativamente. A guanidina do resíduo R54, carregada positivamente, fornece uma interação favorável com o íon sulfato (Figura 37).

Figura 37 - Sítio de ligação do sulfato/fosfato da *SmMTAP* em complexo com tubercidina. Em branco, resíduos do sítio ativo; em verde, tubercidina; em amarelo, sulfato.

Fonte: Elaborada pela autora

A maioria dos resíduos envolvidos na ligação no sulfato/fosfato são conservados, sendo que a maior diferença da *SmMTAP* em relação à *HsMTAP*, são as substituições dos resíduos S12T18 e N87T93. No SLF da *SmMTAP*, a cadeia lateral do resíduo S12 pode assumir duas conformações, uma com o átomo OG apontando para fora e a outra com o átomo OG apontando para dentro do sítio. Quando existe uma treonina nesta posição, sua cadeia lateral assume apenas uma conformação para interagir com o fosfato, dificultando sua interação. A presença de uma S12 parece ser a causa do aumento da flexibilidade conformacional no *loop* do fosfato e por isso a sua ausência no mutante S12T prejudicou profundamente, tanto a eficiência de ligação, quanto a eficiência catalítica (Tabela 4). A serina nesta posição também é observada em outras Nucleosídeos Fosforilases como na *SmPNP* (35, 76) e *HsPNP*. (77)

Já a T93 da *HsMTAP*, forma uma ligação com a molécula de fosfato através de interações com o átomo OG da sua cadeia lateral, que na *SmMTAP* não é observada devido a presença da N87 que não forma essa interação. Como pôde ser visto na cinética do mutante N87T para o substrato fosfato, essa nova interação não é responsável por grandes ganhos na eficiência catalítica, mas, no entanto, essa interação é capaz de reverter o efeito prejudicial causado pela presença de uma T12, como pôde ser visto na cinética do duplo mutante para o substrato fosfato (seção 3.2.3.4).

Uma consequência interessante da mutação N87T, é a presença de duas moléculas de água, próximas do local onde deveriam estar os átomos OD1 e ND2 no SLF se estivesse presente uma N87, devido ao tamanho da cadeia lateral da asparagina não é possível a presença de moléculas de água neste local. No mutante N87T, uma dessas águas interage com a cadeia lateral do resíduo S244 e a outra com a cadeia lateral do resíduo T207. Esses resíduos são conservados na *HsMTAP* humana que apresenta as mesmas interações com as moléculas de água na posição equivalente. Quando uma N87 está presente, as mesmas interações ocorrem, o que indica que não só os resíduos são conservados, mas a interação em si, que ocorre fazendo com que o resíduo N87 não interaja mais com o fosfato (Figura 38).

Figura 38 - Sobreposição do SLF das estruturas da *SmMTAP* nativa (em rosa, com 80% de transparência) e do mutante N87T (em branco). Moléculas de água interagindo com a cadeia lateral dos resíduos S244 e T207 na ausência da N87.
Fonte: Elaborada pela autora

4 Enzima Purina Nucleosídeo Fosforilase de *S.mansoni*

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Amplificação da ORF da SmPNP₂

Após feita uma otimização de códons para expressão em *E. coli* pela OptimumGene™, a ORF do gene da SmPNP₂ foi amplificada por PCR, utilizando a enzima Phusion™ Flash High-Fidelity. A reação foi feita em termociclador, sendo que o anelamento foi feito a 60 °C por 5 minutos e a extensão, a 72 °C por 1 minuto (1 minuto/kbp). Após a reação completa, verificou-se a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1,25% corado com SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen).

Uma vez verificado o produto da amplificação em gel de agarose, o DNA metilado foi digerido pela ação de 5U da enzima DpnI, a digestão ocorreu a 37 °C por 1 hora. A enzima DpnI possui especificidade para DNA metilado e, portanto, digere somente o DNA *template* sem digerir o produto de PCR. Para retirada de excesso de primers, nucleotídeos, sal, da enzima DpnI e eventuais contaminantes, foi utilizado um sistema de purificação por interação magnética utilizando o kit Agencourt AMPure magnetics-bead (Beckman Coulter) segundo instruções do fabricante.

4.1.2 Ligação do produto de PCR em vetor pOPIN e transformação de células de propagação

Com o inserto puro, este foi ligado ao vetor pOPINS3C, que produz a proteína em fusão com uma cauda de histidinas ligada à uma proteína altamente solúvel chamada SUMO (Histag-SUMO). Esse vetor é derivado do vetor pTriEx2, e permite a expressão em múltiplos hospedeiros. (78)

O inserto foi inserido no vetor através da ação da enzima *In-Fusion*. Em uma placa de PCR foi adicionado 100 ng do vetor linearizado, acrescentou-se de 10 a 250 ng do inserto e ajustou-se o volume com água. 10 µl dessa solução foram transferidos para o kit *In-Fusion*® HD Cloning Kits (Clontech) contendo a enzima *In-Fusion* liofilizada.

Após a ligação do inserto, o vetor foi utilizado para transformar bactérias de propagação competentes *E.coli* OmniMax® II (Invitrogen). As células foram mantidas por 30 minutos no gelo na presença do vetor ligado ao inserto, posteriormente foram submetidas a um choque térmico (30 segundos a 42 °C retornando imediatamente ao gelo). Após o choque térmico foi

adicionado 300 µl de meio *SOC* - Invitrogen (sem antibiótico), e então as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora sob agitação (~ 125 rpm).

Terminado o período de incubação, as bactérias foram plaqueadas em LB ágar contendo 50 µg/mL de carbenicilina, 0,02% de X-Gal e 1 mM de IPTG. Este processo foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

4.1.3 Escolha das colônias e transformação de células de expressão

Após o processo anterior, observou-se o crescimento de colônias isoladas brancas e azuis. Colônias azuis são derivadas de bactérias cujo plasmídeo não é recombinante e por isso foram escolhidas duas colônias brancas. Essas colônias foram transferidas para blocos (ABgene AB-0932) que continham 1,2 mL de meio PowerBroth™ suplementado com 50 µg/mL de carbenicilina. Os blocos foram vedados com adesivo poroso (ABgene AB-0718) e mantidos a 37 °C por 16 horas sob agitação.

No dia seguinte, o restante da cultura nos blocos foi centrifugada a 5000 g por 15 minutos, e submetida à extração de DNA plasmidial usando o sistema robotizado *TheOnyx*. Para confirmar a presença do inserto no vetor, foi realizada uma PCR com a enzima *Phusion™ Flash High-Fidelity* usando *primers* específicos para os vetores pOPIN. A reação foi feita em termociclador, sendo que a temperatura de anelamento foi 60 °C por 30 segundos e a temperatura de extensão foi 68 °C por 2 minutos (2 minutos por kbp).

O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com SYBR®Safe DNA Stain (Invitrogen). Após confirmação do inserto no vetor, esse foi utilizado para transformar bactérias de expressão competentes *E.coli* Rosetta2™ (DE3) (Novagen) utilizando o mesmo processo descrito para a transformação das células de propagação. Terminado o período de incubação, as bactérias foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 16 horas, em LB ágar contendo 50 µg/mL de carbenicilina e 35 µg/mL de clorafenicol. Este processo foi realizado em duplicata, e as colônias obtidas foram armazenadas a -80 °C com 30% de glicerol e posteriormente utilizadas para expressão da proteína.

4.1.4 Expressão e purificação da SmPNP2

Para a expressão da SmPNP2, foram feitos pré-inóculos, 20 mL para cada 1L de expressão, em meio PowerBroth™. Os meios foram suplementados com os antibióticos, 50 µg/mL de carbenicilina e 35 µg/mL de clorafenicol, e mantidos por 16 horas sob agitação a 37 °C. No dia seguinte, os pré-inóculos foram transferidos para frascos *Erlenmeyer* que foram mantidos sob agitação a 250 rpm a 37 °C de 3 a 4 horas, até que a D.O. a 595 nm fosse igual ou superior a 0,5. Neste ponto, a temperatura foi reduzida para 20 °C, e a indução da expressão foi realizada com 0,1 mM de IPTG e mantida sob agitação por 16 horas. No dia seguinte, os meios foram centrifugados por 15 minutos a 5000 g, após descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi transferido para tubos de 50 mL e armazenados a -20 °C.

Para a purificação da SmPNP2, foram utilizados dois diferentes protocolos, um desenvolvido pela equipe do laboratório da *Oxford Protein Production Facilities* (OPPF) situado no *Research Complex at Harwell* (RCaH) em Harwell-UK, onde as etapas descritas até aqui foram realizadas, e outro adaptado para as instalações do IFSC. O pellet foi ressuspensionado em tampão de lise (50 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 30 mM imidazole and 0.2% Tween 20) suplementado com 25 µL/mL do coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) e 400 U/mL de Dnase I, foi utilizado aproximadamente, 30 mL de tampão para cada 10 g de células. As células foram lisadas utilizando o Z cell disruptor a 30 kpsi, após este processo, foram centrifugadas por 30 minutos a 30000g a 4 °C. O sobrenadante foi imediatamente aplicado no Äkta Xpress, um sistema automatizado de purificação e análise de proteínas recombinantes em larga escala que realiza a purificação baseada na técnica de cromatografia. O lisado foi aplicado primeiramente em uma coluna de níquel conectada a uma coluna de gel filtração (coluna His-Gel Filtration S200). A proteína + Histag-SUMO foi eluída com 50 mM Tris pH 7,5, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol. As frações que apresentavam alguma proteína foram coletadas para posterior análise em gel SDS PAGE.

No protocolo utilizado no IFSC, as células foram descongeladas e ressuspensionadas em tampão de lise (50 mM Fosfato de potássio pH 7,6, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 5 mM β mercaptoetanol) suplementado com 0,1 mM de ditione (DTT) e 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoride (PMSF). As células foram lisadas por sonicação usando 6 pulsos de 1 minutos com intervalos de 30 segundos entre eles, e novamente centrifugadas a 4700 g por 40 minutos a 4 °C, o lisado foi imediatamente aplicado em coluna de cobalto (Co-NTA agarose, Quiagen). A proteína + Histag-SUMO foi eluída com 50 mM Fosfato de potássio pH 7,6, 300 mM NaCl,

200 mM imidazol e 5 mM β mercaptoetanol), amostras de todos os passos da purificação foram analisadas por SDS-PAGE.

Em ambos os protocolos, o fragmento Histag-SUMO foi clivado por incubação na presença da protease 3C (*Human rhinovirus 3C protease* – GE) a 5 °C por 16 horas, foi utilizado 1U da protease 3C para cada 100 μ g de proteína. Após clivagem, a *SmPNP2* foi isolada por purificação reversa em coluna de níquel (Ni^{2+} -NTA, GE). A proteína foi dialisada em tampão tris (20 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl e 1 mM TCEP) para os ensaios de cristalização e em tampão fosfato (50 mM Fosfato de potássio pH 7,4, 300 mM NaCl) para os demais ensaios, utilizando membrana de diálise Spectra/Por® de 14 KDa MWCO.

4.1.5 Cromatografia de exclusão por massa molecular

Foi realizada uma cromatografia de exclusão por massa molecular para determinar o peso molecular (MW) da *SmPNP2* e assim determinar seu estado oligomérico em solução. A cromatografia foi realizada no AKTA Purifier 10, usando a coluna *Superdex* 200 HR 10/300 (GE) onde foi aplicado 500 μ L de *SmPNP2* a 2 mg/mL. A coluna foi previamente equilibrada com tampão PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10mM Na_2HPO_4 ; 1,8 mM KH_2PO_4 ; pH 7,4), o fluxo de corrida foi de 0,5 mL/min e o andamento da corrida foi monitorado a 280 nm. Para o cálculo da massa da *SmPNP2*, foi utilizado 2 mg/mL dos padrões de massa molecular do Gel Filtration Calibration Kits (GE). Os padrões utilizados foram: Ribonuclease A (13,7 KDa), Anidrase carbônica (29 KDa), Ovalbumina (43 KDa), Albumina sérica bovina (66 KDa), Álcool desidrogenase (150 KDa), β -Amilase (200 KDa), Ferritina (440 KDa) e Tiroglobulina (669 KDa). O Blue Dextran 2000 a 1 mg/mL foi utilizado como padrão para determinar o volume de exclusão da coluna. Proteína e padrões foram preparados no mesmo tampão. Para o cálculo da massa da *SmPNP2*, construiu-se um gráfico do log do MW versus o volume de eluição (V_e) de cada proteína padrão. A linearização da curva foi feita utilizando o programa Origin 7, que calculou a equação da reta ($Y = A + B * X$, onde Y é o log de MW e X o volume de eluição), possibilitando assim, a determinação do MW da *SmPNP2* a partir do seu volume de eluição.

4.1.6 Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Foram realizados ensaios de DSF para a proteína SmPNP2 afim de identificar possíveis substratos e/ou inibidores. Esses ensaios foram realizados assim como descrito para a proteína SmMTAP (seção 3.2.1).

Foram testadas condições do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research, esse kit é um apanhado de pequenas moléculas que possuem capacidade de estabilizar a conformação da proteína, indicando dessa forma, possíveis substratos.

Todas as reações foram feitas em duplicatas, sempre acompanhadas de um controle sem a presença de ligantes. Os dados foram posteriormente analisados, utilizando o programa Microsoft Excel.

4.1.7 Ensaios por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Os ensaios por calorimetria de titulação isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry* - ITC) são utilizados para a determinação de parâmetros termodinâmicos de interação em solução em uma única medida. Os parâmetros inicialmente medidos são: constante de associação (K_a), entalpia (ΔH) e estequiometria (n), e a partir dessas medidas iniciais é possível obter a energia livre de Gibbs (ΔG) e a entropia (ΔS) através da relação demonstrada na equação (1), onde R é a constante dos gases e T é a temperatura absoluta. (79)

$$\Delta G = -R.T \ln K_a = \Delta H - T\Delta S \quad (1)$$

Os ensaios para a SmPNP2 foram realizados no equipamento iTC200 (GE Healthcare Lifesciences) do laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas do Instituto de Química de São Carlos. Os equipamentos para ITC possuem duas celas: uma de amostra, e uma de referência, a qual é geralmente preenchida com água. O equipamento trabalha para que a diferença de temperatura entre as celas, seja sempre igual à 0. Após cada injeção de reagente, surge uma diferença de temperatura devida à energia liberada ou absorvida nas reações químicas de interação. Portanto, a resposta do equipamento (o sinal) será a quantidade de calor produzido por unidade de tempo (Potência térmica = $Q/\Delta t$) necessária para manter igual a 0 a diferença de temperatura entre as celas. (80-81)

Para a realização desses ensaios, a SmPNP2, foi previamente dialisada em tampão contendo, 50 mM Fosfato de potássio pH 7,5, 300 mM NaCl por aproximadamente 16 horas

em membrana de diálise Spectra/Por® (Spectrumlabs corte 14KDa). Foram realizados ensaios de ligação (*binding*), que são capazes de determinar parâmetros termodinâmicos de interação da proteína com determinadas moléculas, e ensaios cinéticos que são baseados na proporcionalidade entre a taxa de uma reação e a potência térmica gerada.

4.1.7.1 Ensaios de ligação (*Binding*)

Os ensaios de *binding* foram realizados para verificar e avaliar a interação entre a *SmPNP2* e moléculas de citosina em solução. Na cela, cujo volume é de 203,8 µl, foi colocada a proteína a uma concentração de 60 µM e na seringa, citosina a 1 mM. Como a reação química gerada após cada injeção de composto libera ou absorve calor, para cada injeção o calor liberado ou absorvido é calculado a partir da linha de base ao final da titulação, em condições onde todos os sítios foram saturados, e é dado pela equação (2), onde q é o calor associado à diferença na concentração de composto ligado, ΔL_i é a diferença na concentração de composto ligado na i -ésima injeção, V é o volume de reação (volume da cela) e ΔH a entalpia (mol de ligante)⁻¹.

$$q = V \cdot \Delta H \cdot [\Delta L_i] \quad (2)$$

Como q é diretamente proporcional à concentração de composto ligado após cada injeção, o calor total liberado ou absorvido pode ser calculado segundo a equação (3), onde Q é o calor total (liberado ou absorvido) e $[L_i]$ é a concentração de composto ligado. (80, 82)

$$Q = V \cdot \Delta H \sum \Delta [L_i] = V \cdot \Delta H \cdot [L_i] \quad (3)$$

Uma vez, que o sinal do equipamento é a potência térmica ($Q/\Delta t$ - µcal seg⁻¹), para análise dos dados, o calor obtido por mol de composto injetado (Q) foi determinado através da integração da área do pico de cada injeção de composto e analisado em função da razão molar entre titulante (presente na seringa) e titulado (presente na cela) com o auxílio do programa Origin Microcal, que estimou pelo ajuste dos dados, os valores de ΔH , n e K_a .

Para os ensaios de *binding* da *SmPNP2* e citosina, foram feitas 19 injeções, sendo uma injeção inicial de 0,4 µL e as demais de 2 µl com intervalos de 120 segundos entre elas com agitação constante de 1000 rpm, a temperatura da reação foi mantida em 25 °C sob pressão

constante. O calor de diluição da citosina, da enzima e do tampão foi calculado e subtraído do calor total gerado pela interação.

4.1.7.2 Ensaio cinético por ITC

Os ensaios cinéticos por ITC foram realizados para determinar os parâmetros cinéticos da SmPNP2 e seus possíveis substratos. Assim como na espectrofotometria, os ensaios cinéticos por ITC visam analisar a taxa de conversão enzimática do substrato à produto, no entanto, nos ensaios de ITC essa análise é feita através de medidas calorimétricas a partir do calor gerado ou consumido durante a atividade enzimática, já que a potência térmica observada, é diretamente proporcional à taxa de formação do produto (Equação (4)). Onde dQ/dt é a potência térmica gerada, $d[P]/dt$ é a taxa de formação do produto, ΔH a entalpia e V_0 volume inicial da reação.

$$\frac{dQ}{dt} = \Delta H \cdot V_0 \cdot \left(\frac{d[P]}{dt} \right) \quad (4)$$

Se rearranjarmos essa equação temos:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{V_0 \cdot \Delta H} \quad (5)$$

Portanto, através da equação (5) podemos determinar de forma direta a velocidade da reação enzimática. Para os ensaios da SmPNP2 foi utilizada a técnica de injeções múltiplas, que consiste de múltiplas injeções de substrato na solução contendo a enzima, que deverá encontrar-se em estado estacionário. Nesse caso, não se tem a medida de ΔH , que foi calculada em um ensaio separado, anterior ao ensaio cinético.

Para a determinação do ΔH , a cela de amostras foi preenchida com 13 μM de enzima e a seringa com 5 mM do substrato testado, ambos diluídos em tampão fosfato (50 mM de fosfato de potássio pH 7,6 e 300 mM de NaCl). Após um período de equilíbrio térmico, foram feitas duas injeções de 5 μl de substrato sob agitação constante de 1000 rpm, intercaladas por 1200 segundos, tempo suficiente para que a reação fosse completamente realizada. O fim da catálise foi indicado pelo retorno da potência térmica para a linha de base, e o calor total envolvido na reação, foi calculado pela integração da área do primeiro pico da titulação menos o calor de diluição do substrato. (81)

Após determinada a entalpia, prosseguiu-se com os ensaios cinéticos, que foram realizados a 20 °C sob pressão constante. Foram feitas 25 injeções de 1 µL de substrato a 5 mM na cela contendo enzima a 500 nM. As injeções foram intercaladas por 60 segundos sob agitação constante de 1000 rpm. Todos os cálculos foram feitos, utilizando-se o programa Origin Microcal, subtraindo o calor de diluição da citosina, da enzima e do tampão.

4.1.8 Cinética enzimática por espectrofotometria

Foram realizados ensaios cinéticos por espectrofotometria para os substratos Inosina e Adenosina no espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices). Para o substrato adenosina, o ensaio foi realizado, assim como descrito na seção 3.1.3. Para o substrato Inosina, os ensaios foram baseados no método descrito por Kalckar, HM et al. (83) que mede indiretamente a formação de hipoxantina (HPX), através da formação de ácido úrico, produzido pela XO a 293 nm, sendo que nesta condição o $\Delta\epsilon$ para a conversão de Inosina é $12,6 \text{ (mM.cm)}^{-1}$. Para a conversão da absorbância medida ao longo do tempo em taxa de formação de produto, foi utilizada a equação de Lambert-Beer. A concentração de *SmPNP2* foi mantida constante à 1 µM. Foram monitoradas simultaneamente, em quadruplicata, 12 diferentes concentrações de substrato que variaram de 4,5 a 400 µM. Após iniciada a reação, a D.O. a 293 nm foi imediatamente monitorada por 10 minutos.

4.1.9 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

A técnica de cromatografia líquida de alta performance (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) foi utilizada para confirmar a formação de citosina a partir de citidina ou a formação de citidina a partir de citosina e R1P, pela ação da *SmPNP2*. Para isso, foram realizados experimentos cinéticos utilizando dois diferentes tampões, tampão fosfato (50 mM de fosfato de potássio pH 7,6 e 300 mM de NaCl) e tampão HEPES (50 mM de HEPES pH 7,6 e 300 mM de NaCl). Foram feitos ensaios variando a concentração de enzima (50, 200 e 1000 nM) e o tempo de incubação da reação à temperatura ambiente (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos). A concentração de substrato foi mantida em todos os experimentos a 1 mM.

As reações foram iniciadas pela adição da enzima *SmPNP2*, foi feita uma solução estoque de onde foram retiradas alíquotas de 500 µL nos tempos pré-determinados, sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para que a reação fosse interrompida. Em seguida, as amostras foram aquecidas por 25 minutos a 85 °C para a total desnaturação da

enzima, uma vez que a T_m determinada pela técnica de DSF, é de 65 °C. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante aplicado na coluna SupelcosilTM LC-18-S da Sigma-Aldrich[®] (uma coluna especificamente projetada para a separação de deoxiribonucleosídeos). As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico formado por um módulo de separação Waters 2695 acoplado ao detector de absorvância Waters 2487. Os tampões utilizados no gradiente foram: Tampão A (97,5% de fosfato de potássio e 2,5% de metanol) e Tampão B (80% de fosfato de potássio e 20% de metanol), para ambos os tampões o pH 4 foi ajustado com ácido fosfórico). Foi utilizado um gradiente em *steps*, sendo que o passo inicial foi de equilíbrio, utilizando somente Tampão A por 2 minutos com fluxo de 1 mL/min. Posteriormente, foi realizado um gradiente linear de 16,7% para 16,8% de tampão B durante 8 minutos, que garantiu a alta eficiência na separação das amostras de interesse. Por fim, 100% de tampão B durante 2 minutos para garantir a total limpeza da coluna para prosseguir com a injeção da próxima amostra. Foram feitas curvas dos seguintes padrões: tampão, citosina, citidina, R1P e do mix desses componentes, que foram diluídos no mesmo tampão da proteína e submetidos ao mesmo processo de preparo das amostras. A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente sendo monitorada pela absorvância a 253 e 270 nm.

4.1.10 Ensaios de Cristalização

Os ensaios de cristalização foram, na maior parte realizados nas dependências do OPPF, onde foi utilizada a técnica de difusão de vapor em “gotas sentadas” utilizando os kits de solução de cristalização WizardTM Classic 1 e 2, Morpheus[®], JCSG-plusTM e Index. Antes de iniciar os ensaios foi realizado um PCT (*Pre-Crystallization Test*), onde foi determinada a concentração ideal de proteína para a cristalização. Os ensaios foram realizados de forma automatizada, utilizando os robôs Hydra, que transfere a solução de cristalização para placas de 96 poços do tipo Greiner e o robô Cartesian que produz gotas de 100 nanolitros e dispensa a proteína sobre elas. Após a montagem das placas, essas foram armazenadas no Formulatrix, um sistema automatizado de estocagem com capacidade de armazenar 1000 placas de cristalização. Esse sistema faz fotografias de cada condição de tempo em tempo por um período pré-determinado e coloca em um banco de dados. Desta maneira foi possível acompanhar a cristalização das proteínas no Brasil.

No IFSC, foram realizados ensaios de cristalização utilizando a mesma técnica descrita acima, para a montagem das placas foi utilizado o robô Honeybee (Genomic Solutions) e os kits de cristalização Morpheus[®] e JCSG-plusTM, as placas foram então armazenadas a 18 °C. Os

cristais obtidos no Brasil foram crioprotetidos e enviados para coleta de dados no síncrotron DLS situado no *RCaH*. Os cristais obtidos no OPPF foram crioprotetidos e já submetidos à difração de raios X também no DLS.

4.1.11 Coleta, Processamento e refinamento das estruturas obtidas

A coleta, o processamento e o refinamento dos dados da *SmPNP2*, foram feitos assim como descrito na seção 3.1.5. Para a substituição molecular, foi utilizada a estrutura da *SmPNP1* (3FB1). (84)

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Amplificação e clonagem da *SmPNP2*

A ORF do gene da proteína *SmPNP2* foi amplificado, e o produto das amplificações foram purificados e clonados no vetor pOPINS3C que foi utilizado para transformar bactérias competentes *E.coli* OmniMax[®] II (Invitrogen). Os vetores foram propagados, através da cultura de bactérias e extraídos para serem submetidos à uma PCR a fim de confirmar a presença do inserto no plasmídeo. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com SYBR[®]Safe (Figura 39). Depois de confirmada a presença do inserto por PCR, os plasmídeos foram em seguida inseridos em bactérias competentes *E.coli* Rosetta2[™] (DE3) para expressão.

Figura 39 - Visualização da amplificação por PCR do inserto contendo a ORF do gene da enzima *SmPNP2* (~896 pb) a partir dos vetores extraídos de cultura de bactérias *E.coli* OmniMax[®] II (Invitrogen). **1.** Padrão de peso molecular; **2, 3 e 4.** Bandas referentes à amplificação do inserto da *SmPNP2*.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.2 Expressão e purificação da enzima SmPNP₂

A enzima SmPNP₂ foi expressa satisfatoriamente em meio PowerBroth™ induzido com IPTG a 20 °C por 16 horas sob agitação, alíquotas antes e após indução foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE (Figura 40-A). Para purificação, dois protocolos foram usados, um desenvolvido pela equipe da OPPF e o outro adaptado para as instalações do IFSC. Para a purificação realizada na OPPF, a cultura foi lisada utilizando o um disruptor de células, a solução foi centrifugada e o sobrenadante aplicado no Äkta Xpress, alíquotas da proteína purificada foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 40-B). Na purificação realizada no IFSC, as células foram lisadas por sonicação e posteriormente centrifugadas, o sobrenadante foi aplicado em coluna de cobalto (Co-NTA agarose, Quiagen). A proteína foi eluída com imidazol e alíquotas de todos os passos da purificação foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 40-C). Em ambos os protocolos, a SmPNP₂ foi purificada com alto grau de pureza e bom rendimento (Figura 40).

Figura 40 - Visualização da expressão e purificação da SmPNP₂ em SDS-PAGE. **A.** Expressão após indução com IPTG, 1 - Padrão de peso molecular; 2 e 4 - Expressão da SmPNP₂ antes da indução com IPTG; 3 e 5- Expressão da SmPNP₂ após indução com IPTG. **B.** Purificação com protocolo da OPPF, 1 - Padrão de peso molecular; 2, 3 e 4 - Frações da purificação. **C.** Purificação com protocolo adaptado para o IFSC, 1 - Padrão de peso molecular; 2 - Fração insolúvel; 3 - Eluato; 4 - Lavado e 5 - Eluição da SmPNP₂. (Produto da purificação ~44,9 KDa).

Fonte: Elaborada pela autora

A SmPNP₂ foi expressa fusionada à um fragmento Histag-SUMO que foi clivado pela ação da protease 3C (*Human rhinovirus 3C protease* – GE), foram coletadas alíquotas ao longo do tempo para acompanhar a clivagem (Figura 41-A). Após clivagem, a SmPNP₂ foi isolada por purificação reversa em coluna de níquel (Ni²⁺-NTA, GE), frações da purificação reversa foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 41-B).

Figura 41 - Visualização da clivagem ao longo do tempo e purificação reversa da *SmPNP2* em SDS-PAGE. **A.** Acompanhamento da clivagem ao longo do tempo, 1 - Padrão de peso molecular; 2, 3, 4 e 5 alíquotas com 2, 4, 6 e 8 horas após início da clivagem. **B.** Purificação reversa após clivagem, 1 - Padrão de peso molecular; 2 - Proteína antes do início da clivagem; 3 - Proteína após término da clivagem; 4 - Eluato; 5 - Lavado. (Produto da purificação ~44,9 KDa, Proteína clivada ~31,6 KDa e Histag-SUMO ~13,3 KDa).
 Fonte: Elaborada pela autora

4.2.3 Cromatografia de exclusão por massa molecular

A massa molecular teórica da *SmPNP2* foi determinada por cromatografia de exclusão por massa molecular, possibilitando a determinação do seu estado oligomérico em solução. Na cromatografia de exclusão por massa molecular, as moléculas são separadas de acordo com diferenças de tamanho e forma, à medida que vão passando por uma matriz porosa de partículas esféricas inerte com estabilidade física e química. A matriz é equilibrada com tampão, que preenche os poros e o espaço entre as partículas. As amostras são eluídas de forma isocrática, sendo que proteínas com maior massa molecular migram mais rápido, pois tendem a não penetrar nos poros da matriz enquanto que moléculas com massa molecular menor tendem a penetrar nos poros e migram vagarosamente através da coluna. Após purificada por cromatografia de afinidade em coluna de cobalto, a *SmPNP2* foi aplicada na coluna de exclusão molecular Superdex 200 HR 10/300, e um pico majoritário foi observado após um volume de 15,13 mL de eluição (Figura 42-A). A partir do Log da massa molecular de cada proteína padrão e o do volume de eluição, construiu-se um gráfico de regressão linear, cuja equação de reta é dada por: $\text{Log MW} = 4,88 - 0,1956 * V_e$ (Figura 42-B).

Figura 42 - Resultado da determinação da massa molecular da SmPNP₂ através da cromatografia de exclusão por massa molecular. **A.** Perfil cromatográfico da eluição da SmPNP₂ com um pico majoritário de eluição a 15,13 mL. Setas apontam para os volumes de eluição das proteínas padrão, de 669, 440, 200, 150, 65, 43, 29 e 13 KDa, utilizadas para a calibração da coluna Superdex 200 HR 10/300. **B.** Reta de calibração da coluna, construída a partir do volume de eluição de proteínas cuja MW é conhecida. A equação da reta é dada por $\text{Log MW} = 4,15451 - 0,1956 * V_e$.

Fonte: Elaborada pela autora

A partir da equação de reta dada pelo gráfico da Figura 42-B, determinou-se que a massa molecular da SmPNP₂ eluída no pico majoritário é de aproximadamente 83 KDa, o que corresponde a um estado oligomérico em solução de trímero.

4.2.4 Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Como já discutido na seção 3.2.2, a técnica DSF ou Thermofluor[®], é utilizada para determinar condições que estabilizam a proteína, mas também pode ser usada para detectar possíveis substratos ou inibidores que se ligam à proteína, estabilizando a forma nativa. Por não se conhecer a função da isoforma 2 da SmPNP, utilizamos essa técnica para fazer uma busca inicial por possíveis substratos e assim determinar sua função.

Inicialmente foi feito um teste para verificar qual a melhor razão entre as concentrações de proteína e do fluoróforo SYPRO[®] Orange em que se obtinha o melhor sinal. Foram testadas seis concentrações de 1 a 6 μM de proteína versus de 2,5 a 7,5x a concentração de SYPRO[®] Orange, o melhor sinal obtido foi com 2,5x de SYPRO e proteína a 6 μM . Foram testadas 96 diferentes condições do kit Silver Bullets[™] bio HR2-088 da Hampton Research (Composição de cada solução vide Anexo B), segundo instruções do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicatas, sempre acompanhadas de um controle sem a presença de ligantes. Os dados foram posteriormente analisados, utilizando o programa Microsoft Excel, como o desvio padrão das T_m da referência foi igual à 0, foram considerados qualquer valor positivo. O gráfico da

análise e a tabela de condições que ocasionaram aumento do ΔT_m , podem ser visualizados abaixo na Figura 43.

Figura 43 - ΔT_m do ensaio de DSF para a *SmPNP₂* na presença de diferentes condições. Qualquer valor positivo foi considerado significativo. As condições que geraram aumentam da T_m foram: A2, A3, A12, C4, D1, D2, D12 e H7. Fonte: Elaborada pela autora

Os aumentos de T_m foram obtidos nas condições A2, A3, A12, C4, D1, D2, D12 e H7 do Kit. A condição H7 teve o maior aumento de T_m ($\Delta T_m = 2,5$). A diferença de T_m entre o controle e as amostras testadas, foi discreta, porém suficientes para indicar uma ligação mais forte entre a proteína e algum composto contido na solução testada. A pequena diferença entre as T_m era esperada, uma vez que a proteína foi dialisada em tampão fosfato, visando manter sua estabilidade e solubilidade. A composição das soluções que ocasionaram aumento de T_m , está descrita na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição das condições do Kit Silver bullets™ bio HR2-088, que ocasionaram aumento de T_m no ensaio de DSF para a SmPNP₂.

Condição	Componentes (Kit Silver Bullets Bio HR2-088)	ΔT_m
A2	0.16% w/v L-Carnitine hydrochloride, 0.16% w/v Tannic acid, 0.16% w/v Aspartame, 0.16% w/v Caffeine, 0.16% w/v p-Coumaric acid, 0.16% w/v 4-Hydroxy-L-proline, 0.02 M HEPES sodium pH 6,8	2
A3	0.16% w/v Disodium beta-Glycerophosphate tetrahydrate, 0.16% w/v trans-Cinnamic acid, 0.16% w/v O-Phospho-L-tyrosine, 0.16% w/v Netaine anhydrous, 0.16% w/v Cytidine, 0.02M HEPES sodium pH 6,8	1
A12	0.20% w/v 2'-Deoxyadenosine 5' triphosphate disodium salt, 0.20% w/v Benzidine, 0.20% w/v L-Carnitine hydrochloride, 0.20% w/v Sulfanilamide, 0.20% w/v Cytosine, 0.02 M HEPES sodium pH 6,8	2
C4	0.20% w/v, Cytosine, 0.20% w/v Vitamin B12, 0.20% w/v Pepstatin A, 0.20% w/v Shikimic acid, 0.20% w/v N-acetyl-L-glutamic acid, 0.02 M HEPES sodium pH 6,8	1
D1	0.20% w/v Cytosine, 0.20% w/v Pyridoxine, 0.20% w/v Hemin, 0.20% w/v L-Carnosine, 0.20% w/v Cytidine 5'-diphosphocholine sodium salt dihydrate, 0.02 M HEPES sodium pH 6,8	1
D2	0.20% w/v Cytosine, 0.20% w/v α -D-Glucose 1-phosphate disodium salt hydrate, 0.20% w/v trans-Dehydroandrosterone, 0.20% w/v Isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside, 0.20% w/v D-(-)-Ribose, 0.02 M HEPES sodium pH 6,8	2
D12	0.16% w/v L-Homoserine, 0.16% w/v 4 Hydroxy-L-proline, 0.16% w/v Argininosuccini acid disodium salt hydrate, 0.16% w/v Cytidine, 0.16% w/v Inosine, 0.16% w/v Guanine, 0.02M HEPES sodium pH 6,8	0,5
H7	0.16% w/v 2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate sodium salt hydrate, 0.16% w/v Thymidine 5'-triphosphate sodium salt, 0.16% w/v 4-Aminobenzoic acid, 0.16% w/v Cytosine, 0.16% w/v Benzamidine hydrochloride, 0.16% w/v β -Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt, 0.02 M HEPES sodium pH 6,8	2,5

Fonte: Elaborada pela autora

Ao analisar as condições que ocasionaram aumento de T_m , (Tabela 9), percebe-se que curiosamente, com exceção da condição A2, todas as demais condições apresentam em comum a presença do nucleosídeo citidina (CTN) ou da sua base correspondente, citosina (CYT). Além disso, dentre as 96 condições do kit, apenas as condições A3, A12, C4, D1, D2, D12 e H7 possuem na sua composição citidina ou citosina, ou seja, todas as condições do kit que continham citidina ou citosina causaram aumento de T_m . Em contrapartida, das 7 condições que continham algum tipo de purina, apenas a condição D12 apresentou aumento de T_m , mas, no entanto, essa condição apresenta também, em sua composição 0,16% de citidina, portanto, esses resultados indicam que a SmPNP₂ apresenta uma preferência em ligar pirimidinas ao invés de purinas.

Apesar de a SmPNP₂ ser, aparentemente, uma isoforma da SmPNP₁, as duas proteínas quando comparadas, possuem apenas 61,3% de identidade (alinhamento, vide seção 1.10), valor relativamente baixo tratando-se de isoformas para uma mesma proteína, além disso, a SmPNP₂ codifica para uma proteína com 299 aminoácidos, sendo maior que a SmPNP₁ e, portanto, é possível que na verdade não se trate de duas isoformas, mas sim, de duas proteínas diferentes com funções diferentes.

Pouco se sabe sobre a via de salvação de pirimidinas em *S. mansoni*, o único estudo encontrado sobre esta via data de 1990 e usa extrato de vermes como material de estudo. Esse trabalho, não descreve atividade fosforolítica para citosina, citidina ou deoxicidina, mas relata

que a citidina é o precursor mais eficientemente utilizado na via de salvação de pirimidinas para incorporação aos ácidos nucleicos no verme adulto. Os autores, atribuem essa rápida incorporação exclusivamente à ação da enzima Uridina citidina quinase (UCK), uma vez que também não é descrita ação de uma citidina deaminase que pudesse agir para que a incorporação fosse via Uracila. No entanto, é estranho observar uma maior eficiência para incorporação de citidina, uma vez que a atividade catalítica da UCK para uridina (URI) é maior do que a observada para citidina. (85) Ademais a concentração de uridina no sangue humano é aproximadamente 30 vezes maior que a concentração de citidina, não justificando portanto, essa alta eficiência na utilização de citidina como precursor, fica claro então, que deva existir uma entidade capaz de aumentar os níveis de citidina endoplasmática, deslocando a atuação da UCK.

Buscas no banco de dados de metaboloma humana (HMDB) (86) revelam que a concentração de citosina no sangue é de aproximadamente 6,4 μM , enquanto a concentração de citidina é de apenas $\sim 0,1 \mu\text{M}$, e que ainda a concentração citoplasmática de R1P é de 60 μM , portanto, o *S. mansoni* vive em um meio em que há grande disponibilidade tanto de citosina quanto de R1P, o que justificaria a adaptação da *SmPNP2* na via de salvação de pirimidinas, atuando na fosforólise reversa da citidina, uma vez que a Uridina fosforilase (UP) que é tida como a Pirimidina nucleosídeo fosforilase da via, não apresenta atividade para citidina ou citosina.

Os ensaios de DSF indicam o quão fortemente um composto se liga à proteína, mas não necessariamente, indica a afinidade relativa da proteína por aquele composto. Por isso, a partir dos dados aqui descritos, buscou-se caracterizar as interações entre a *SmPNP2* e as bases pirimidínicas e o nucleosídeo correspondente, em especial citosina e citidina, respectivamente.

4.2.5 Ensaios por calorimetria de titulação isotérmica (ITC)

Para caracterizar, termodinamicamente a interação entre a *SmPNP2* e seus possíveis substratos, foram realizados ensaios de *binding* por calorimetria de titulação isotérmica no equipamento iTC200 (GE Healthcare Lifesciences) no laboratório de Bioquímica e Biofísica de Proteínas do Instituto de Química de São Carlos. Inicialmente buscou-se avaliar os parâmetros termodinâmicos de interação com citidina e adenosina, através da titulação desses nucleosídeos na *SmPNP2* presente na cela. No entanto, não foi possível realizar as medidas, uma vez que após o final de cada titulação não foi observado a volta do sinal para a linha de base, indicando que não houve saturação dos sítios. Pressupôs-se então, que sob as condições

utilizadas nos ensaios de ITC, a SmPNP2 poderia catalisar a fosforólise da citidina e adenosina liberando o sítio e, portanto, não havendo saturação. Prosseguiu-se então com a caracterização termodinâmica da interação entre a SmPNP2 e citosina, que foi titulada na cela contendo a enzima (Figura 44), o ensaio foi feito em triplicata e os calores da diluição da citosina, da enzima e do tampão foram subtraídos do calor total gerado pela interação. A média dos parâmetros obtidos é apresentada na tabela da Figura 44.

Figura 44 - Termograma da interação da SmPNP2 com citosina. No painel acima, pode-se visualizar a variação da potência gerada após cada injeção de citosina; no painel abaixo, está plotado o calor gerado após cada injeção versus a razão molar. Ao lado, uma tabela contendo os valores dos parâmetros termodinâmicos dessa interação.
Fonte: Elaborada pela autora

O modelo matemático usado para ajustar a isoterma foi o de um único sítio, sendo que o número de sítios n encontrado a partir do ajuste revela que a interação dá-se na razão 1:1 (1 molécula de citosina para cada protômero da SmPNP2). Os parâmetros termodinâmicos indicam que o processo de interação entre a SmPNP2 e citosina é favorável tanto do ponto de vista entálpico ($\Delta H < 0$), como entrópico ($\Delta S > 0$).

O valor da K_d para interação entre a citosina e a *SmPNP2* foi de $27 \pm 3 \mu\text{M}$. Não existe na literatura estudos termodinâmicos da interação de uma PNP com bases pirimidínicas, não sendo, portanto, possível realizar uma comparação direta. É descrito para a PNP em eritrócito humano um valor de K_d igual à $1,6 \mu\text{M}$ para o substrato hipoxantina (87) e para PNP no baço de bezerros, o valor de $0,08 \mu\text{M}$ para o substrato guanina. (88) O valor da K_d da *SmPNP2* para citosina indica baixa eficiência na interação desse substrato se comparado aos valores apresentados pelas PNPs humana e bovina, respectivamente, no entanto se levarmos em consideração que a citosina possui apenas 1 anel heterocíclico aromático enquanto a hipoxantina e a guanina possuem ambas um anel heterocíclico fundido à um grupo imidazol, o valor de K_d para citosina parece não ser tão discrepante, já que guanina e hipoxantina farão um maior número de interações no sítio em comparação com a citosina que, portanto, certamente terá uma força de interação menor do que as outras duas bases.

Por não haver um método espectrofotométrico descrito para a realização de ensaios cinéticos para a fosforólise de citidina, foram realizados para esse substrato ensaios cinéticos por ITC, utilizando a técnica de injeções múltiplas no mesmo equipamento acima citado. Para a realização desse ensaio, foi necessário a determinação prévia do ΔH_{app} , que foi feita em um ensaio separado através da integração da área sobre a curva isoterma. Além do substrato citidina, foram feitos também ensaios para a determinação do ΔH_{app} , dos substratos, adenosina, guanosina, inosina, timidina (THM) e uridina (Figura 45), visando detectar a possível interação da *SmPNP2* com esses compostos.

Figura 45 - Termograma da determinação do ΔH_{app} da *SmPNP2* para os compostos ADN, CTN, GNO, NOS, THM e URN. Variação da potência gerada após a injeção de cada composto.
Fonte: Elaborada pela autora

Como pode ser visto na Figura 45, a troca de calor nas condições em que o experimento foi realizado foi baixa na presença dos compostos adenosina, inosina, uridina, guanosina e timidina e, portanto, não foi possível realizar os experimentos de cinética, uma vez que o valor aqui encontrado indica uma rápida volta do sistema para a condição de equilíbrio, o que inviabiliza a continuidade dos experimentos, uma vez que é necessário que as injeções de compostos sejam feitas em condições de reação estacionária. (89) É possível que ao variar a temperatura na qual o ensaio é realizado, a variação entálpica seja detectável, mas caso isso não ocorra, é provável que não há reação enzimática para aquele composto. Infelizmente não houve tempo hábil para tais experimentos, mas, por outro lado foi possível a determinação dos parâmetros cinéticos por espectrofotometria, utilizando uma reação acoplada, para os compostos adenosina e inosina (discutidos a seguir). Para os demais compostos, a possível catálise será avaliada oportunamente.

Uma vez obtida uma alta variação entálpica para o substrato citidina nas condições utilizadas, prosseguiu-se com a determinação dos parâmetros cinéticos por calorimetria. O ensaio cinético foi feito à temperatura e pressão constante, com 25 injeções, intercaladas por 60 segundos, de 1 μL de citidina a 5 mM na cela, preenchida com 203,8 μL de SmPNP2 a 500 nM, ambas soluções foram preparadas em tampão contendo 20 mM de fosfato inorgânico. O valor dos parâmetros foi obtido em triplicata e o resultado desse ensaio pode ser visto na Figura 46.

continua

continuação

Parâmetros cinéticos da fosforólise da citidina pela <i>SmPNP2</i>			
K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$V_{\text{máx}}$ (mM/s)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
$76,3 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,2$	0,001	$26,2 \pm 0,1$

Figura 46 - Resultado dos ensaios cinéticos por calorimetria de titulação isotérmica para a *SmPNP2* com citidina. **A**, variação da potência gerada após cada injeção de citidina; **B**, ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de citidina pela *SmPNP2*. No inserto, é mostrado o calor gerado no ensaio de determinação do ΔH_{app} . À baixo, tabela contendo os valores dos parâmetros cinéticos da fosforólise da citidina.

Fonte: Elaborada pela autora

Durante a determinação do ΔH_{app} notou-se uma leve diminuição no calor gerado durante a segunda injeção (inserto do painel B da Figura 46), que pode ser devido à inibição enzimática pelo produto (dados não mostrados). No entanto, os dados foram bem ajustados pelo modelo proposto, indicando que a cinética aqui é bem descrita pelo modelo simples de Michaelis-Menten.

De acordo com Bzowska *et. al* (90), as PNPs podem ser agrupadas em duas classes, as de baixo peso molecular, encontradas principalmente em tecidos de mamíferos e em algumas poucas bactérias, e as de alto peso molecular, que são predominantemente encontradas em bactérias. As de alto peso molecular, aceitam tanto os nucleosídeos 6-oxo purinas (p. ex.

inosina, guanosina) quanto os 6-amino purinas (p. ex. adenosina), já as PNPs de baixo peso molecular, aceitam apenas os nucleosídeos 6-oxo purinas como substrato. Recentemente, foi demonstrada a atividade catalítica de PNPs por citidina e citosina em *E. coli* e em algumas bactérias termófilas (91-92), no entanto tratam-se todas de PNPs de alto peso molecular. Os ensaios cinéticos para a SmPNP₂ revelam que essa enzima não só aceita compostos contendo o grupo amino na posição 4 do anel heterocíclico (correspondente à posição 6 do anel heterocíclico das purinas), como também é capaz de catalisar a fosforólise da citidina eficientemente. É a primeira vez que esse fato é descrito para uma PNP de baixo peso molecular.

4.2.6 Cinética enzimática por espectrofotometria

Uma vez que não foi observada grande variação entálpica nas condições utilizadas durante os ensaios calorimétrico, a caracterização cinética da SmPNP₂ para os substratos adenosina e inosina foi realizada por espectrofotometria, utilizando uma reação acoplada com a enzima Xantina Oxidase. Esses ensaios foram baseados nos métodos descritos por Buckoreelall, K. et al (50) e Kalckar, HM et al. (83) para os substratos adenosina e inosina, respectivamente.

4.2.6.1 Cinética enzimática para a fosforólise de adenosina

A curva de velocidade por concentração de substrato e o valor dos parâmetros cinéticos obtidos para a fosforólise de adenosina pela SmPNP₂ são mostrados na Figura 47.

Parâmetros cinéticos da fosforólise da adenosina pela SmPNP ₂	
K_M (μM)	$22,31 \pm 2,46$
k_{cat} (s ⁻¹)	$1,02 \pm 0,02$
$V_{m\acute{a}x}$ (mM/s)	0,001
k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ .s ⁻¹)	$45,9 \pm 5,2$

Figura 47 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise de adenosina pela SmPNP₂. Ao lado, tabela contendo o valor médio dos parâmetros cinéticos obtidos nessa reação.

Fonte: Elaborada pela autora

Os dados cinéticos mostram que a *SmPNP2* também é capaz de ligar e catalisar a fosforólise da adenosina (uma 6-amino purina), mas de maneira menos eficiente em comparação à *SmMTAP*, a qual apresentou um K_M 7x menor e um k_{cat}/K_M quase 200x maior para esse substrato (vide seção 3.2.3.2). Portanto, fica claro mais uma vez, que a atividade fosforolítica para adenosina descrita para o *S. mansoni* (25-28) é na sua maior parte, devido a atuação da *SmMTAP*. Os dados aqui apresentados, justificam a não completa inibição dessa atividade pelo inibidor específico de MTAPs (5'-dClFormicina) (32), já que uma pequena parcela da atividade fosforolítica é exercida pela ação da *SmPNP2*.

Poucos organismos possuem PNPs capazes de fosforilar adenosina, já que essa atividade é exclusiva de PNPs de alto peso molecular, e mesmo tais organismos apresentam ampla preferência por inosina. Os dados aqui descritos, mostram pela primeira vez, uma PNP de baixo peso molecular capaz de catalisar eficientemente uma 6-amino purinas. A *SmPNP1*, mesmo em altas concentrações de adenosina, não é capaz de fosforolisar esse substrato, mas, no entanto, a adenosina pode se ligar ao sítio ativo da *SmPNP1*, competindo com seu substrato natural, inosina. A ligação da adenosina no sítio ativo da *SmPNP1*, só é possível devido a inversão da cadeia lateral do resíduo N245, que possibilita a interação entre o átomo OD1 da cadeia lateral com o nitrogênio da posição 6 do nucleosídeo. Entretanto, essa inversão desfavorece a interação do átomo N1 da cadeia lateral com o nucleosídeo, já que agora a interação deverá acontecer com o nitrogênio da posição N7 impossibilitando dessa maneira a catálise. (49)

Através de estudos de mutagênese sítio dirigida para a PNP humana e de murinos, uma única substituição no sítio ativo (N243D, que corresponde ao N245, nas *SmPNPs*) permitiu a catálise de adenosina. (93-94) Apesar de ser de forma ineficiente, a interação concomitante entre átomos de oxigênio da cadeia lateral e os nitrogênios da posição N6 e N7 do nucleosídeo, parece ser um fator importante para que a catálise de adenosina aconteça. É interessante observar que na posição correspondente, tanto na *SmPNP1* quanto na *SmPNP2*, está presente uma asparagina (N245) assim como nas PNPs nativa humana e de murinos, e ainda assim, a *SmPNP2* é capaz de catalisar adenosina, apresentando K_M 33x menor e k_{cat}/K_M 3x maior do que o mutante N243D da PNP humana. Fica claro, portanto, que os fatores que atuam na especialização da *SmPNP2* por amino purinas, vão além das interações entre a cadeia lateral do resíduo N245 e o nucleosídeo no sítio ativo.

A comparação entre parâmetros cinéticos obtidos por ITC e espectrofotometria, mostra que a variação dos resultados obtidos por essas técnicas é mínima, e que portanto, é segura a comparação entre parâmetros cinéticos obtidos por ambas as técnicas. (89) Assim, a comparação dos parâmetros cinéticos da *SmPNP2* para citidina e adenosina, mostra que há uma

maior preferência na ligação com adenosina (K_M 4x menor), mas que, no entanto, a eficiência catalítica para esses dois substratos é bem próxima (k_{cat}/K_M 1,7x maior para adenosina), sugerindo que apesar da dificuldade na interação, a SmPNP2 é bem adaptada para realizar a catalise de citidina.

4.2.6.2 Cinética enzimática para a fosforólise de Inosina

A curva de velocidade por concentração de substrato e o valor dos parâmetros obtido para a fosforólise da inosina pela SmPNP2 são mostrados na Figura 48.

Figura 48 - Ajuste de Michaelis-Menten para fosforólise da inosina pela SmPNP2. Ao lado, tabela contendo o valor médio dos parâmetros cinéticos obtidos nessa reação.

Fonte: Elaborada pela autora

Quando comparada à SmPNP1, a SmPNP2 apresenta menor eficiência na interação (K_M ~20x maior) e na catálise (k_{cat}/K_M 5x maior) para o substrato inosina. No entanto, é interessante observar que o número de moléculas de inosina convertidas por unidade de tempo pela SmPNP2 é maior do que o observado para SmPNP1 (k_{cat} ~ 4x maior para a SmPNP2). (47) Quanto ao modo de ligação, a SmPNP2 se aproxima mais da HsPNP com um K_M apenas 3x maior, enquanto que o modo de catalisar inosina, se aproxima mais do que é visto para a SmPNP1 já que a eficiência enzimática para esse substrato na HsPNP é aproximadamente 25x maior do que para a SmPNP2.

O K_M para inosina, foi o maior dentre os substratos testados para a SmPNP2 (K_M 6x maior para adenosina e 1,5x maior para citidina). Esses valores revelam uma preferência da

*SmPNP*₂ em ligar bases que possuem o grupo amino como principal constituinte do anel heterocíclico, uma inversão do que ocorre na *SmPNP*₁ e demais PNPs que possuem ampla preferência na ligação de 6-oxo purinas. Por outro lado, o k_{cat} , para a conversão de inosina foi muito maior em comparação aos demais substratos (k_{cat} 8x maior para adenosina e citidina), o que fez com que a eficiência catalítica fosse muito próxima para os três substratos testados. Portanto, vemos que a isoforma PNP em *S. mansoni* perdeu sua eficiência na ligação e catálise de inosina, mas por outro lado ganhou capacidade catalítica para os substratos adenosina e citidina.

4.2.7 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Os ensaios por HPLC foram realizados a fim de comprovar, de forma definitiva, a capacidade catalítica da *SmPNP*₂ em gerar citosina a partir de citidina, uma pirimidina. Para isso, foi utilizada uma solução contendo 50 mM de fosfato de potássio e 1 mM de citidina, a reação foi iniciada com a adição de 200 nM de *SmPNP*₂, nesse momento uma alíquota foi imediatamente retirada como sendo correspondente ao tempo 0 de reação (T_0), demais alíquotas foram retiradas ao longo de 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30 e 40 minutos (T_1 , T_2 , T_5 , T_{10} , T_{15} , T_{20} , T_{30} e T_{40} , respectivamente). A cromatografia foi realizada a temperatura ambiente e monitorada pela absorbância a 253 e 270 nm (Figura 49). Na figura abaixo, não está apresentado o cromatograma referente aos controles, tampão e R1P, pois não foi possível detectar sinal desses compostos no comprimento de onda utilizado.

Figura 49 – Cromatogramas da análise cromatográfica da formação ao longo do tempo de citosina a partir de citidina pela ação da *SmPNP*₂ na presença de fosfato.

Fonte: Elaborada pela autora

Podemos ver acima, que durante o gradiente com tampão B, a citosina é o primeiro composto eluído, após 2,1 - 2,3 minutos de retenção e, em seguida a citidina, após 3 - 3,6 minutos de retenção, o que garantiu uma alta eficiência na separação. A partir da sobreposição dos cromatogramas acima, nota-se que imediatamente após a adição da SmPNP2 (T_0), já é possível observar a formação de citosina a partir de citidina. Ao decorrer do tempo é nítido o consumo de citidina pela SmPNP2 gerando citosina e provavelmente R1P, após 40 minutos de reação (T_{40}), observa-se a conversão quase total do substrato em produto.

Diante dos resultados dos três diferentes ensaios até aqui realizados (DSF, ITC e HPLC), não resta dúvidas de que a SmPNP2 atua também na via de salvação de pirimidinas em *S. mansoni*. Esse achado incrível mostra que o eficiente consumo de citidina na via de salvação de pirimidinas em vermes adultos, não é devido somente a ação da UCK, como foi proposto por el Kouni e colaboradores em 1990 (85), mas deve-se também à presença de uma enzima especialmente adaptada para catalisar citidina.

Devido à concentração de citosina no sangue humano ser 64x maior que a concentração de citidina (86), pensou-se na possibilidade da SmPNP2 atuar também na reação inversa da fosforólise da citidina, sintetizando citidina a partir de citosina e R1P. Para testar essa hipótese foram analisadas, de forma análoga à mencionada anteriormente, a reação reversa da fosforólise de citidina. A reação foi preparada contendo 1 mM de citosina e 1 mM de R1P diluídos em tampão HEPES, o processo de preparo das amostras, os tempos de reação, a concentração de SmPNP2 e as condições para a corrida cromatográfica, foram as mesmas descrito anteriormente. O monitoramento da absorbância à 253 nM pode ser visto na Figura 50-A, onde pode-se observar que a geração de citidina a partir de citosina e R1P, foi mínima ao longo de 40 minutos. Por isso, foi feita uma nova reação com uma concentração de enzima 5x maior (1 μ M) (Figura 50-B).

Figura 50 – Cromatogramas da formação ao longo do tempo de citidina a partir de citosina e RIP pela ação da *SmPNP2*. **A.** Reação enzimática com 200 nM de *SmPNP2*; **B.** Reação enzimática com 1 μ M de *SmPNP2*.
Fonte: Elaborada pela autora

A partir dos cromatogramas apresentados observa-se que com o aumento da concentração enzimática, houve um leve aumento na síntese de citidina pela *SmPNP2*, mostrando que a enzima é capaz de realizar a reação reversa. No entanto, existe uma ampla preferência catalítica pela quebra da citidina ao invés da síntese, fato esse que justifica mais uma vez a eficiente incorporação de citidina ao metabolismo dos vermes adultos sob condições experimentais. No entanto, não é descartada a hipótese de que quando o verme se encontra no

seu ambiente natural, o hospedeiro, a alta concentração de citosina e R1P no sangue humano desloque o equilíbrio fazendo com que a SmPNP2 atue majoritariamente na síntese de citidina.

4.2.8 Cristalização e co-cristalização da SmPNP2

Os ensaios de cristalização da proteína SmPNP2 se deu tanto nas dependências do OPPF, quando nas dependências do IFSC. Antes de iniciar os ensaios foi realizado um PCT, onde foi determinada a concentração ideal de proteína para a cristalização que foi de 5 mg/mL. Para cada ensaio foram utilizados até 4 kits que continham 96 diferentes condições de cristalização. Os kits utilizados foram Wizard™ Classic 1 e 2, Morpheus®, JCSG-*plus*™ e Index. Foram realizados ensaios de cristalização com a enzima na forma apoenzima e ensaios de co-cristalização com os ligantes: R1P, Inosina, Hipoxantina, Citidina e Citosina. Os cristais da SmPNP2 atingiram seu tamanho máximo em ~3 dias, e então foram crio-protegidos e submetidos à difração de raios X no DLS. Alguns dos cristais obtidos são mostrados na Figura 51.

Figura 51 - Cristais da SmPNP2. **1** – Cristal com a proteína na forma apoenzima; **2** – Cristal co-cristalizado com inosina; **3** – Cristal co-cristalizado com hipoxantina e **4** – Cristal co-cristalizado com R1P.
Fonte: Elaborada pela autora

Foram obtidos 29 conjuntos de dados para a SmPNP2, dos quais resultaram em 4 estruturas inéditas (SmPNP2 na forma apoenzima, SmPNP2 em complexo com MES, SmPNP2 em complexo com citosina e etileno e SmPNP2 em complexo com citosina e R1P). A estrutura APO, foi determinada por substituição molecular, utilizando a estrutura da SmPNP1 (PDB 3FB1) como modelo, as demais estruturas foram determinadas também por substituição molecular, mas agora utilizando a estrutura APO como modelo. O refinamento foi finalizado através do programa Phenix, a estatística da coleta de dados e do refinamento, podem ser vistas na Tabela 10 abaixo. O fator de estrutura e as coordenadas das estruturas obtidas foram depositados no banco de dados PDB.

Tabela 10 - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados para a *SmPNP2*.

	<i>SmPNP2-apo</i>	<i>SmPNP2-MES</i>	<i>SmPNP2-CYT-EDO</i>	<i>SmPNP2-CYT-RIP</i>
<i>Coleta dos dados</i>				
Detector	Pilatus 2M	Pilatus 6M	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF
Parâmetros da cela (Å) a; b; c α ; β ; γ	99,55; 99,55; 99,55 90; 90; 90	97,78; 97,78; 97,78 90; 90; 90	99,13; 99,13; 99,13 90; 90; 90	98,64; 98,64; 98,64 90; 90; 90
Grupo Espacial	P2 ₁ 3	P 2 ₁ 3	P 2 ₁ 3	P 2 ₁ 3
Resolução (Å)	44,52-1,57 (1,61-1,57) ^c	43,73-1,74 (1,79-1,74) ^c	70,10-1,36 (1,41-1,36) ^c	69,75-1,42 (1,46-1,42) ^c
Fonte de Raios X	I04-1	I02	I04	I04
λ (Å)	0,92	0,979	0,979	0,979
Multiplicidade	6,8 (7,0) ^c	11,0 (10,5) ^c	10,6 (10,0) ^c	11,4 (9,1) ^c
R _{merge} (%)	5,5 (62,3) ^c	5,8 (68,9) ^c	13 (93,1) ^c	7,6 (147,3) ^c
R _{pim} (%)	2,5 (27,1) ^c	1,9 (23,3) ^c	4,2 (46,2) ^c	2,4 (56,0) ^c
CC (1/2)	0,998 (0,832) ^c	1 (0,844) ^c	0,994 (0,60) ^c	0,999 (0,540) ^c
Completeza (%)	100 (100) ^c	100 (100) ^c	100 (100) ^c	100 (99,9) ^c
Número de Reflexões	312485 (23781) ^c	354427 (22974) ^c	737563 (43532) ^c	689682 (40358) ^c
Número de Reflexões únicas	46089 (3379) ^c	32239 (2370) ^c	69723 (7274) ^c	60417 (4438) ^c
I/ σ	18,0 (2,9) ^c	25,4 (3,6) ^c	8,4 (1,5) ^c	15,9 (1,3) ^c
<i>Refinamento dos dados</i>				
n° de reflexões usadas no refinamento	46050	31691	69526	60379
R(%) ^a	18,53	15,0	17,46	16,19
R _{free} (%) ^b	21,24	19,11	19,16	17,85
n° de átomos da proteína	2180	2173	2541	2550
n° de átomos do ligante	-	11	29	30
B (Å ²)	18,79	17,33	15,64	17,93
Erro de coordenadas (ML based) (Å)	0,15	0,18	0,18	0,16
Erro de fase (°)	21,18	17,07	21,68	17,39
PDB ID	5CXQ	5CXS	5KO5	5KO6

^a $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ onde $|F_c|$ é a amplitude do fator de estrutura calculado do modelo e $|F_o|$ é a amplitude do fator de estrutura observado do modelo.

^b R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento. (56)

^c Valores entre parênteses referem-se aos valores da mais alta resolução.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.9 Validação dos modelos

Antes de se iniciar a análise das estruturas obtidas, fez-se a avaliação e validação dos modelos assim como descrito na seção 3.2.6. Os valores de R e R_{free}, foram mostrados na Tabela 10 acima, os valores são coerentes e considerados bons em relação ao valor da resolução obtida. Os dados gerados por todas as análises do MolProbity podem ser visualizados na Tabela 11.

Tabela 11 - Análise das estruturas da SmPNP2 gerada pelo programa MolProbity.

<i>Parâmetros Analisados</i>	<i>SmPNP2 Apo</i>	<i>SmPNP2 MES</i>	<i>SmPNP2 CYT-EDO</i>	<i>SmPNP2 CYT-RIP</i>	<i>Ref</i>
MolProbity score ¹	1,14	1,39	1,45	1,11	-
Clashscore ²	2,73	2,93	4,27	2,92	-
Rotâmeros ruins (%)	1,26	2,53	2,08	0,83	< 0,3%
Ramachandran outliers (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	< 0,05%
Desvio C β > 0.25 ^a (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Res. com ligações ruins (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0%
Res. com ângulos ruins (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	< 0,1%

¹ MolProbity score: combina o valor do clashscore, rotâmeros e as avaliações do Ramachandran em uma única pontuação, normalizada para estar na mesma escala que a resolução dos dados de raios X.

² Clashscore: é o número de sobreposições ruins graves (> 0,4 Å) para cada 1000 átomos.

Fonte: Elaborada pela autora

Os dados apresentados, com exceção dos rotâmeros, estão dentro do referencial proposto pelo programa. Os resíduos que apresentaram desvio na conformação preferencial foram checados e não apresentaram erros estruturais. Assim os padrões analisados pelo MolProbity foram considerados ideais e, portanto, as estruturas foram validadas para análise.

4.2.10 Análise estrutural da SmPNP2

As quatro estruturas resolvidas possuem alta resolução e, portanto, foi possível uma análise altamente detalhada da estrutura e dos ligantes encontrados no sítio ativo. Na Figura 52 abaixo é possível visualizar o mapa de densidade eletrônica do conjunto processado com a enzima na forma apo com resolução a 1,5 Å.

Figura 52 - Densidade eletrônica da estrutura da SmPNP2-apo a 1,5 Å de resolução. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1 σ . Figura gerada no programa PyMOL.

Fonte: Elaborada pela autora

O conteúdo da unidade assimétrica foi estimado pelo Coeficiente de Matthews, indicando a presença de um monômero por unidade assimétrica (Figura 53-B). Como visto na seção 4.2.7, a unidade funcional da *SmPNP₂* é um trímero, que foi gerado utilizando a ferramenta “*Draw Cell & Symmetry*” do programa COOT. (55) O trímero possui as subunidades relacionadas por um eixo de simetria de ordem 3, que apresenta o enovelamento clássico das Nucleosídeos Fosforilases de baixo peso molecular como pode ser visualizado na Figura 53-A.

Figura 53 - **A.** Estrutura do trímero da *SmPNP₂*. **B.** Estrutura do monômero da *SmPNP₂*. Ambas figuras em modelo de fitas coloridas por gradiente de cadeia.
Fonte: Elaborada pela autora

O contato entre as subunidades é extenso, envolve 24 resíduos de uma subunidade e 25 resíduos da subunidade vizinha, esse contato é composto de 136 ligações não covalentes, 9 ligações de hidrogênio e 2 pontes salinas (Figura 54).

Figura 54 - Interação dos resíduos na interface entre os monômeros A e B, gerada pelo PDBsum generate. !!!!!! Ligações não covalente; — Ligação de hidrogênio e — ponte salina. Resíduos em azul, carregados positivamente; Em vermelho, carregados negativamente; Em verde, resíduos neutro; Em cinza, resíduos alifáticos; Em lilás, resíduos aromáticos; Em laranja, prolina e glicinas.
Fonte: Elaborada pela autora

A estrutura SmPNP₂-CYT-EDO possui no sítio de ligação do fosfato uma molécula de etileno glicol (EDO) (Figura 55-A), oriunda do tampão de cristalização. A condição de cristalização foi a A2 do kit Morpheus[®] que consiste em 10% PEG 8000, 20% etileno glicol, 0,03 M de cátions divalente e 0,1 M de MES/imidazol pH 6,5). (70) A estrutura SmPNP₂-MES, foi oriunda de uma co-cristalização com R1P, porém não foi observado a densidade correspondente a esse composto na estrutura, entretanto foi identificada uma molécula de MES oriunda do tampão de cristalização ligada ao sítio ativo (Figura 55-B). A condição de cristalização desta estrutura foi a E3 do kit Morpheus[®] que consiste em 10% PEG 4000, 20% glicerol, 20 mM de alcoóis (1,6-hexanediol, 1-butanol, (RS)-1,2-propanediol, 2-propanol, 1,4 butanediol e 1,3-propanediol) e 100 mM MES/imidazol pH 6,5.

Figura 55 - Ligação de compostos oriundos do tampão de cristalização no sítio ativo da *Sm*PNP₂. **A.** Ligação do etileno glicol; **B.** Ligação do MES.
Fonte: Elaborada pela autora

A ligação de compostos com grupos sulfato não é uma novidade em se tratando das PNPs de *S. mansoni*, pois o grupo sulfato do MES se liga no sítio de ligação do fosfato. Foi obtido um complexo da SmPNP1 com o NDSB-195 (non-detergentsuphobetaine 195) que também foi utilizado como aditivo na cristalização. O NDSB se ligou no sítio ativo da SmPNP1 nos subsítios de ligação do fosfato e da ribose (48), assim como visto para o composto MES na SmPNP2. Quando se sobrepõe as duas estruturas observa-se uma semelhança de ligação entre o MES e o NDSB195 (Figura 56).

Figura 56 - Sobreposição das estruturas, SmPNP2 em complexo com MES (branco) e SmPNP1 (subunidade A) em complexo com NDSB195 (azul), mostrando que a ligação dos dois compostos é bastante similar nas duas estruturas.
Fonte: Elaborada pela autora

4.2.10.1 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas

Análises da estrutura secundária e topologia da *SmPNP₂* foram obtidas através do programa ProMotif (95) disponível no servidor pdbsum. (96) O monômero da *SmPNP₂* consiste de um único domínio α/β , composto por 1 folha β , 9 fitas β , 2 unidade beta-alpha-beta, 2 β -hairpins, 1 psi loop, 4 β -bulges, 12 α -hélices, 6 interações hélice-hélice, 18 β -turns e 2 γ -turns (Figura 57).

Figura 57 - Estrutura secundária da *SmPNP₂* em função da sequência de aminoácidos gerada pelo programa ProMotif disponível no pdbsum. Símbolos: estrutura secundária, espirais α -hélices e setas fitas β ; H1, H2, ..., numeração das hélices; A, B, classificação das folhas; β beta turn; γ gamma turn; beta hairpin. Fonte: Elaborada pela autora

A SmPNP₂ apresenta, assim como a SmPNP₁, uma grande folha β central composta de 9 fitas β , cuja topologia é: $\beta 2, \beta 3, \beta 4, \beta 1, \beta 5, \beta 9, \beta 6, \beta 7$ e $\beta 8$. A folha β central é flanqueada por 12 α hélices. Abaixo, na Figura 58, observa-se a estrutura secundária e o diagrama da topologia do monômero da SmPNP₂.

Figura 58 - Estrutura secundária e topologia do monômero da SmPNP₂. **A.** Representação dos elementos da estrutura secundária do monômero da SmPNP₂. Hélices em vermelho; Loops em cinza; Fitas em amarelo. **B.** Diagrama da topologia do monômero da SmPNP₂. Fitas são representadas por setas rosa, Hélices por cilindros vermelho e Loops em azul. Figura gerada pelo pdbsum.

Fonte: Elaborada pela autora

Entre as Nucleosídeos Fosforilases de baixo peso molecular, a maioria dos resíduos envolvidos no sítio ativo são conservados. Em comparação com a PNP de mamífero (humana e de camundongo), dos 20 resíduos que interagem no sítio ativo, a SmPNP₂ apresenta apenas 4 substituições, sendo que a substituição de uma fenilalanina por uma tirosina na posição 202 e a substituição de uma valina por uma serina na posição 247, é comum à SmPNP₁. Entre os resíduos que fazem interação diretamente com o ligante, somente 1 é substituído exclusivamente na SmPNP₂: a substituição de uma alanina por uma leucina na posição 118.

Os resíduos que não fazem parte diretamente do sítio ativo também aparecem conservados, esses resíduos aparecem próximos uns dos outros formando grandes sequências conservadas, nessas sequencias, também aparecem substituições exclusivas da SmPNP₂ (Figura 59).

Figura 59 - Alinhamento das PNP's de *S. mansoni*, humana e de *M. musculus*, gerado pelo ESPrpt. As setas em preto indicam fitas β; espirais, α-helices; o símbolo TT, β-turns; o símbolo TTT, α-turns; os resíduos em escritos em branco com fundo vermelho são conservados e os escritos em vermelho com fundo branco são os resíduos não conservados, mas de propriedades similares; A seta em amarelo, indica o único resíduo do sítio ativo que interage diretamente com o ligante, que difere do sítio ativo das demais PNP's analisadas.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.11 Sítio ativo da *SmPNP2*

Assim como as demais Nucleosídeos fosforilases, o sítio ativo da *SmPNP2* está localizado próximo a interface entre os monômeros, mas diferente da *SmMTAP* e assim como na *SmPNP1*, não há participação de resíduos da subunidade vizinha no sítio ativo. O sítio ativo é dividido em três subsítios: sítio de ligação do fosfato (SLF), sítio de ligação da base (SLB) e sítio de ligação da ribose (SLR). Na Figura 60 abaixo, pode ser visualizado o diagrama LigPlot⁺

(75), onde está esquematizada as interações com os ligantes obtidos nos sítios ativo das quatro estruturas da SmPNP₂.

Figura 60 - Diagrama LigPlot⁺ para as interações dos ligantes no sítio ativo da SmPNP₂. **A.** Citosina; **B.** R1P; **C.** MÊS; **D.** Etileno glicol. Ligações de hidrogênio estão representadas por linhas tracejadas entre os átomos envolvidos, contatos hidrofóbicos estão representados por um arco com raios que irradiam para os átomos em contato. Fonte: Elaborada pela autora

4.2.11.1 Sítio de ligação da base (SLB)

Diferente do que é observado para a *SmMTAP* e *SmPNP1*, na *SmPNP2* não é observado movimentos estruturais induzidos pela presença do ligante no sítio. No entanto, nota-se uma leve alteração de como a citosina interage no sítio quando está presente juntamente uma molécula de R1P. Na estrutura *SmPNP2*-CYT, o resíduo E203 faz três interações com a molécula de citosina enquanto na estrutura *SmPNP2*-CYT-R1P, o E203 faz apenas 2 interações. Quando a molécula de R1P não está presente, a molécula de citosina faz outras duas interações com uma molécula de água que é ancorada pela molécula de etileno glicol ligada no sítio de ligação do fosfato. Quando a R1P está ligada, essa molécula de água não interage com a citosina e passa a fazer uma interação com o O1' do fosfato da R1P (Figura 68).

Figura 61 - Sítio de ligação da base das estruturas *SmPNP2*-CYT e *SmPNP2*-CYT-R1P. Em branco, estrutura da *SmPNP2*-CYT; em rosa, estrutura *SmPNP2*-CYT-R1P. Linha pontilhada amarela indica interações na estrutura *SmPNP2*-CYT; linha pontilhada preta indica interações na estrutura *SmPNP2*-CYT-R1P.

Fonte: Elaborada pela autora

São doze os resíduos envolvidos no SLB, são eles: L118, A119, G120, Y202, E203, V219, G220, M221, N245, S247, I257 e V262, sendo que apenas dois (E203 e N245) fazem interações diretas com o ligante (Figura 60-A). Os resíduos do SLB nas PNPs de baixo peso molecular são de maneira geral conservados, mas no entanto, a *SmPNP2* apresenta duas substituições em relação à *SmPNP1* (L118A e I257P).

A região compreendida entre os resíduos 244 e 257 é chamada de *Gate loop* nas NPs, na SmPNP2 apresenta oito substituições em relação à SmPNP1 (A244T; N246I; I248V; A251V; N253S; V255L; S256K e I257P), a posição 244 e 256 para todas as PNPs de mamíferos, é conservada e apresenta uma treonina e uma lisina, respectivamente. Essas substituições na SmPNP2, causam um deslocamento estrutural que permite a formação de uma pequena α -hélice (α -hélice 11) entre os resíduos 246 a 255 (Figura 62), que não é vista na SmPNP1.

Figura 62 - Formação da α -hélice 11 na SmPNP2. Sobreposição das estruturas SmPNP2-CYT-EDO (em branco) e SmPNP1 em complexo com inosina (pdb 3FAZ) (em ciano).

Fonte: Elaborada pela autora

A substituição de uma isoleucina por uma asparagina na posição 246, estabiliza a formação da α -hélice 11 na SmPNP2. A presença de uma asparagina na posição 246, permite a interação do oxigênio da cadeia lateral desse resíduo com o nitrogênio da cadeia principal dos resíduos I248 e L249, essas interações posicionam a cadeia principal dos resíduos posteriores, permitindo o surgimento das ligações de hidrogênio entre os grupos NH e CO da cadeia principal dos resíduos subsequentes, formando, portanto, a α -hélice 11. O correto posicionamento da cadeia lateral do resíduo N246 é fundamental para a formação da α -hélice, por isso além das interações com o átomo de oxigênio, o átomo de nitrogênio da sua cadeia lateral interage ainda com o grupo CO da cadeia principal dos resíduos N123 e L126, essas

interações causam o travamento da cadeia lateral do resíduo N246 na posição correta para a formação da α -hélice Figura 63.

Figura 63 – Interações da cadeia lateral do resíduo N246 com os resíduos I248 e L249 do N-cap da α -hélice 11 na *SmPNP2*.
Fonte: Elaborada pela autora

A formação dessa pequena hélice, causa o deslocamento do C^α de todos os resíduos compreendidos entre as posições 244 a 257. O deslocamento da cadeia lateral do resíduo N245, permite a interação do átomo O1 desse resíduo com o grupo amino da citosina, sem que haja necessidade da inversão da cadeia lateral. Na *SmPNP1* a inversão da cadeia lateral do resíduo N245 permite a ligação da adenosina no sítio, mas a interação desfavorável entre o N1 da cadeia lateral e o N7 do nucleosídeo, pode ser o fator responsável pela inabilidade em catalisar adenosina. (49) Na *SmPNP2*, por não haver tal inversão, o nitrogênio da cadeia lateral do resíduo N245, fica livre para interagir com a cadeia lateral do resíduo D250, essa interação só é possível devido a formação da α -hélice 11 que faz com que o resíduo D250 fique voltado para dentro da estrutura. Na interação com citosina os átomos N4 e N3 (que corresponde à posição N7 da adenosina) interagem com os átomos de oxigênio da cadeia lateral do resíduo E203 que sofre uma mudança conformacional ocupando o espaço que na *SmPNP1* é ocupado por uma molécula de água (Figura 64).

Figura 64 - Sobreposição do sítio de ligação da base das estruturas *SmPNP2*-CYT e *SmPNP1* em complexo com adenosina (pdb 3F8W). A formação da α -hélice 11, orienta a posição da cadeia lateral do resíduo D250 que passa a interagir com o grupo NH da cadeia lateral do resíduo N245. Essa interação permite que o grupo OH da cadeia lateral do N245 interaja com o ligante sem a necessidade a inversão da cadeia lateral. Em branco, estrutura da *SmPNP2*-CYT; em ciano, estrutura da *SmPNP1* em complexo com adenosina; linha pontilhada amarela indica interações entre citosina e o SLB da estrutura *SmPNP2*-CYT; linha pontilhada preta indica interações entre adenosina e o SLB da estrutura da *SmPNP1* em complexo com adenosina.

Fonte: Elaborada pela autora

Infelizmente não obtivemos nenhuma estrutura da *SmPNP2* em complexo com adenosina, e por isso não foi possível fazer uma comparação direta das ligações desse composto no sítio ativo da *SmPNP1* e *SmPNP2*, mas as observações feitas acima, permitem afirmar que a formação de uma α -hélice no SLB, é o fator diferencial que possivelmente dá à *SmPNP2*, habilidade para catalisar a fosforólise de adenosina e citidina.

4.2.11.2 Sítio de ligação da ribose (SLR)

Para a caracterizar o sítio de ligação da ribose, foram utilizadas as estruturas *SmPNP2*-CYT-R1P e *SmPNP2*-MES. Na ligação com a R1P, doze resíduos participam da interação: G34,

S35, R86, H88, Y90, N117, L118, Y202, M221, S222, H259 e V262, sendo que quatro desses interagem diretamente com a porção ribose (S35, Y90, Y202 e H259) (Figura 60-B). Quando o composto MES está ligado, apenas o resíduo Y202 participa da interação, sem que seja com o grupo sulfato (Figura 60-C). Na ligação com MES é vista também, uma interação entre o nitrogênio da posição N4 do MES e o oxigênio de uma molécula de água. A presença ou não de diferentes compostos no SLR, não induz mudanças estruturais na *SmPNP₂*, observa-se apenas uma inversão da posição da cadeia lateral do resíduo S35, quando o sítio está ocupado.

Os resíduos do SLR nas PNPs, são muito conservados, sendo que a identidade sequencial, chega a 100% para diversos organismos. A *SmPNP₂* apresenta, neste sítio, duas substituições em relação à *HsPNP* (L118A116 e Y202F200) e uma em relação à *SmPNP₁* (L118A), essa última substituição impede o movimento no *loop* fosfato, que será discutido na próxima seção. A interação da R1P no SLR na *SmPNP₂* e *SmPNP₁* é igual, poucas diferenças são observadas quando estão presente moléculas de água, cujas posições não são conservadas. A comparação do SLR da *SmPNP₂* com o SLR da *SmPNP₁* ocupado por uma molécula de ADN ou NOS, também não revela diferenças no modo de ligação dos resíduos deste sítio com a porção ribose.

4.2.11.3 Sítio de ligação do Fosfato (SLF)

Os resíduos pertencentes ao SLF são: G34, S35, R86, H88, N117, L118 e S222. Nenhuma das estruturas obtida para *SmPNP₂* possuem uma molécula de PO₄/SO₄ no SLF, no entanto este sítio foi encontrado ocupado nas estruturas *SmPNP₂*-MES, *SmPNP₂*-CYT-EDO e *SmPNP₂*-CYT-R1P pelo grupo sulfato da molécula de MES, pelo grupo fosfato da molécula de R1P e pelo etileno glicol, respectivamente. Na ligação com R1P, o grupo fosfato interage diretamente com os resíduos S35, R86, H88 e S222 (Figura 60-B), na ligação com MES, o grupo sulfato interage diretamente com os resíduos S35, L118 e S222 (Figura 60-C), e na ligação com etilenos glicol, somente os resíduos S35 e L118 interage diretamente com o ligante (Figura 60-D), portanto, os resíduos S35 e L118 aparecem como essenciais para as interação no SLF. Apesar de conter diferentes compostos ligados no SLF, nenhuma mudança estrutural entre as quatro estruturas da *SmPNP₂* foi observada.

Na SmPNP1, nota-se um deslocamento de aproximadamente 6,4 Å no *loop* entre os resíduos C33 e K39 (*loop* fosfato), que é induzido pela presença de compostos no SLB, porém esse movimento não ocorre quando está presente uma molécula de adenosina, já que essa não é catalisada, portanto, na SmPNP1 são possíveis duas diferentes conformações do *loop* fosfato, enquanto na SmPNP2, somente a conformação fechada é observada (Figura 65-A). O deslocamento no *loop* do fosfato acontece devido à mudança conformacional na cadeia lateral do resíduo K39, que desloca o resíduo G38, culminando em um deslocamento da cadeia lateral do resíduo L37 de aproximadamente 4,9 Å. A S35 que é o principal resíduo do SLF, fica exatamente no meio do *loop* do fosfato sendo, portanto, o resíduo que sofre o maior deslocamento (~ 6,4 Å) (Figura 65-B).

Figura 65 - *Loop* fosfato nas SmPNPs. Sobreposição das estruturas SmPNP2-CYT-R1P (em branco), SmPNP1 em complexo com adenosina (pdb 3F8W) (em ciano) e SmPNP1 em complexo com hipoxantina (pdb 3FNQ) (em laranja). Linha pontilhada preta indica a distância do deslocamento causado pelo movimento do *loop* fosfato. **A.** Deslocamento do *loop* do fosfato, induzido pela presença de ligantes catalisáveis no SLB na SmPNP1. **B.** Mudanças conformacionais que propiciam o movimento no *loop* fosfato na SmPNP1.

Fonte: Elaborada pela autora

Na *SmPNP2*, devido a presença de uma leucina na posição 118 (substituição L118A em comparação com a *SmPNP1*), a movimentação do *loop* fosfato é impedida, devido a presença de uma leucina na posição 118, cuja cadeia lateral causaria um choque estérico com a cadeia lateral do resíduo S35, caso houvesse o movimento do *loop* fosfato (Figura 66).

Figura 66 - Choque estérico que impede a movimentação do *Loop* Fosfato na *SmPNP2*. Sobreposição das estruturas *SmPNP2*-CYT-R1P (em branco), *SmPNP1* em complexo com adenosina (pdb 3F8W) (em ciano) e *SmPNP1* em complexo com hipoxantina (pdb 3FNQ) (em laranja).
Fonte: Elaborada pela autora

4.2.12 Comparações Estruturais

4.2.12.1 Comparação estrutural entre as quatro estruturas da *SmPNP2*.

As quatro estruturas da *SmPNP2*, quando alinhadas apresentam pequenas diferenças estruturais entre si, já que a presença ou não de ligantes induz mudanças conformacionais na cadeia lateral dos resíduos. Essas mudanças são medidas pelo RMSD (*root mean square deviation*), esse parâmetro indica o quanto uma estrutura diverge em relação à outra, quando estão sobrepostas. Assim valores baixos de RMSD indicam menores divergências entre as estruturas. (71) Foram comparados os RMSDs entre os trímeros das quatro diferentes estruturas, os resultados obtidos são mostrados abaixo nas Tabela 12.

Tabela 12 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos trimeros da *SmPNP2*. Valores calculados pelo alinhamento no programa PyMOL.

<i>SmPNP2</i>			
Apo	Apo		
MES	0,271	MES	
CYT-EDO	0,273	0,267	CYT-EDO
CYT-R1P	0,240	0,310	0,157

Fonte: Elaborada pela autora

Nota-se que o maior valor de RMSD, acontece entre os trimeros da estrutura *SmPNP2*-MES e *SmPNP2*-CYT-R1P e o menor valor entre os trimeros da estrutura *SmPNP2*-EDO e *SmPNP2*-R1P, é provável que essa menor diferença se deve ao fato de que em ambas as estruturas se encontra ligada uma molécula de citosina.

4.2.12.2 Comparação estrutural entre a *SmPNP2* e a *SmPNP1*

Quando a estrutura da *SmPNP2*-Apo é sobreposta com o monômero da *SmPNP1* em complexo com inosina o RMSd é de 0,64 Å para o monômero e de 0,95 Å para o trimer. As maiores diferenças observadas na estrutura estão no *loop* compreendido entre os resíduos 53-68 e no *gate loop* (resíduos 244-257) (Figura 67).

Figura 67 - Sobreposição dos monômeros das estruturas PNP2 (azul) e PNP1 (verde) de *S. mansoni*, evidenciando as diferenças conformacionais encontradas. A. No *loop* entre os resíduos 53-68; B. No *gate loop*, entre os resíduos 246-257.

Fonte: Elaborada pela autora

Várias diferenças são observadas na estrutura no sítio ativo, como já foi discutido na seção 4.2.11. As diferenças mais marcantes são as quatro substituições (PNP1/PNP2): S35T, A118L, C208S e T244A, e a mudança conformacional na cadeia lateral dos resíduos E203 e N245 (Figura 68).

Figura 68 - Sobreposição da *SmPNP*₂ na forma APO (branca) com a *SmPNP*₁ (verde) para parte do sítio ativo. As principais substituições e mudanças conformacionais são apontadas.

Fonte: Elaborada pela autora

4.2.12.3 Comparação estrutural entre PNPs de diferentes organismos.

Existe no PDB 110 estruturas de PNPs oriunda de 23 diferentes organismos, dessas estruturas depositadas, quanto a unidade funcional: 1% é dímero, 8% é monômero, 26% é hexâmetro (encontradas principalmente em bactérias) e 65% é trímero. Nós comparamos a estruturas tridimensional da *SmPNP*₂ com a PNP dos seguintes organismos: *Homo sapiens* (mamífero) (pdb 1RFG); *Toxoplasma gondii* (protozoário) (pdb 3MB8); *Anopheles gambiae* (inseto) (2P4S) e *Thermus thermophilus* (bactéria) (pdb 1ODI). Abaixo na tabela 12, são mostrados os valores de RMSD da sobreposição entre os monômeros (cadeia A) das diferentes PNPs em relação à *SmPNP*₂, e na figura 21 a sobreposição dessas estruturas.

Tabela 13 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros da SmPNP₂ e monômeros de PNPs de diferentes organismos depositadas no PDB. Valores calculados pelo alinhamento no programa PyMOL.

Estruturas Sobrepostas	RMSD
PNP2 de <i>Schistosoma mansoni</i> e PNP de <i>Homo sapiens</i> (1RFG)	1,11
PNP2 de <i>Schistosoma mansoni</i> e PNP de <i>Toxoplasma gondii</i> (3MB8)	2,72
PNP2 de <i>Schistosoma mansoni</i> e PNP de <i>Anopheles gambiae</i> (2P4S)	1,19
PNP2 de <i>Schistosoma mansoni</i> e PNP de <i>Thermus thermophilus</i> (1ODI)	7,36

Fonte: Elaborada pela autora

Figura 69 - Sobreposição da estrutura tridimensional da SmPNP₂ com a estrutura de PNPs de diferentes organismos depositadas no PDB. **A-** SmPNP₂ em branco e HsPNP (1RFG) em rosa; **B-** SmPNP₂ em branco e TgPNP (3MB8) em amarelo; **C-** SmPNP₂ em branco e AgPNP (2P4S) em pink; **D-** SmPNP₂ em branco e TtPNP (1ODI) em petróleo.

Fonte: Elaborada pela autora

A estrutura tridimensional das PNPs é bem conservada, as estruturas que mais se distanciaram da *Sm*PNP₂, foram as estruturas, cuja unidade funcional é um hexamero (*Toxoplasma gondii* (3MB8) e *Thermus thermophilus* (1ODI)).

5 CONCLUSÕES

Os resultados aqui descritos, contribuíram para o alcance dos objetivos inicialmente propostos, de investigar de forma detalhada o mecanismo catalítico da *SmMTAP* e de determinar o papel catalítico da enzima *SmPNP2*. O alcance desses objetivos, permitiram a caracterização estrutural e bioquímica das duas nucleosídeos fosforilase, de *S. masoni*, alvos deste trabalho.

A relação ecológica desenvolvida entre indivíduos de diferentes espécies, vai além de uma associação íntima e duradoura, é sobre tudo, uma associação metabólica, onde a interação parasita hospedeiro gera uma pressão seletiva, que redesenha as vias metabólicas do parasita, que conseqüentemente perde um número significativo de genes associados à suas funções biossintéticas. (97) Análises do genoma usando GeneDB (98) e KEGG revelam que o *S. masoni* não possui as enzimas envolvidas na síntese de poliaminas e nem as envolvidas na conversão de MR1P a L-metionina, portanto, o parasita não produz MTA e nem possui recursos para aproveitar o MR1P. Sendo o sangue humano, fonte inesgotável de L-metionina (cerca de 1,7% da sua composição total) sugere-se, portanto, que a ação da *SmMTAP* acontece exclusivamente na via de salvação de purinas, na conversão de adenosina em adenina e Ribose-1-fosfato (R1P). Neste trabalho, foram determinados os parâmetros cinéticos, para a fosforólise de MTA, adenosina e 2'-deoxyadenosina, bem como a atividade catalítica para adenosina na presença e ausência de fosfato pela ação da *SmMTAP* e dos seus cinco mutantes. O volume de dados cinéticos, juntamente com os aspectos metabólico citados acima, corroboram para hipótese de a *SmMTAP* ser de fato, a Adenosina fosforilase descrita por diversos autores (25-30) nas décadas de 70 e 80.

A obtenção dos mutantes da *SmMTAP*, bem como o estudo estrutural e bioquímico possibilitaram o aumento do conhecimento das funções catalíticas dessa importante enzima. As técnicas de estudo utilizadas nesse trabalho, permitiram dizer que 2dADN é substrato e inosina não é substrato para a *SmMTAP*, e que essa enzima é capaz de catalisar ADN mesmo na ausência de fosfato. A comparação das 13 estruturas da *SmMTAP*, permitiram a observação de um grande movimento estrutural nas regiões conhecidas como *gate loop* e *loop fosfato*. O *gate loop* apresenta um movimento de “tampa”, que se fecha quando um composto se liga ao sítio ativo e se abre quando o sítio é liberado, a conformação aberta do *gate loop* é mantida pela formação de pontes dissulfeto entre os resíduos C233 e C242, nunca antes descritas para MTAPs.

O resíduo Q289 se mostrou extremamente importante no sítio ativo, pois mesmo estando no SLR, contribui no SLF permitindo à *SmMTAP* catalisar ADN na ausência de fosfato. Outra mutação pontual, a S12T, também reverteu a capacidade da *SmMTAP* em catalisar ADN na ausência de fosfato. Não se sabe se a presença concomitante de ambas mutações causaria o mesmo efeito já que as mutações duplas S12T/N87T e tripla S12T/N87T/Q289L não causaram essa reversão. A mutação Q289L revelou também, que a presença de uma leucina na posição 289 desfaz a interação com a subunidade vizinha no sítio ativo, o que facilita a entrada dos compostos no bolso catalítico e permite uma melhor estabilização da proteína na forma apoenzima, mas que, no entanto, a catálise dos compostos testados é amplamente comprometida com essa substituição, mesmo quando o substrato testado é o fosfato que se liga apenas ao SLF.

O principal resíduo na ligação do fosfato é a S12, o resíduo N87 mesmo possuindo características similares, não exercer tamanha influência nessa ligação. A presença de uma treonina na posição 12, impossibilita a ligação e utilização do fosfato, uma vez que a presença desse resíduo diminui a mobilidade do *loop fosfato*. A presença concomitante de uma T87 gera interações que amenizam este travamento, revertendo os efeitos causados pela T12. Apesar do resíduo N87 estar no SLF, seus efeitos parecem estar mais relacionados com as interações dos nucleosídeos, uma vez que a presença da treonina nessa posição não altera tanto a ligação com fosfato, mas prejudica a catálise dos nucleosídeos testados, em especial a catálise de adenosina. Portanto, esse resíduo pode ser apontando como o principal fator da especialização da *SmMTAP* em catalisar adenosina.

Os estudos da isoforma 2 da *SmPNP*, revelam que a enzima, assim como as demais nucleosídeo fosforilase é um trímero em solução, e que além de catalisar eficientemente adenosina e inosina, possui a incrível capacidade fosforolítica para citidina, (uma pirimidina), apresentando associação com citosina equivalente à apresentada para hipoxantina e guanina nas PNP's humana e bovina, respectivamente. A atividade catalítica da *SmPNP2* com citidina foi comprovada por HPLC, ensaio que revelou também, que apesar de haver ampla preferência pela fosforólise, a *SmPNP2* possui capacidade de sintetizar citidina a partir de citosina e R1P. A análise na composição sanguínea humana, revela uma enorme diferença entre a concentração de citosina e R1P em comparação com citidina, o que pode levar à um deslocamento do equilíbrio, fazendo com que a *SmPNP2* atue predominantemente na síntese de citidina.

Os ensaios de DSF e de cinética enzimática mostram que a *SmPNP2* se liga mais fortemente à citidina e citosina do que aos compostos púricos testados e que existe uma equidade na eficiência catalítica para os compostos adenosina, inosina e citidina, apesar da afinidade ser maior por adenosina. Apesar disso, a alta eficiência catalítica da enzima *SmMTAP*

por adenosina frente à *SmPNP2* configura um cenário metabólico, em que a *SmPNP2* exerce um papel secundário na catálise da adenosina, atuando preferencialmente na via de salvação de pirimidinas, fato esse que justifica a eficiente incorporação de citidina ao metabolismo do parasita.

Quatro substituições são observadas no sítio ativo da *SmPNP2* em comparação à *SmPNP1*, a principal delas é a substituição N246I que possibilita a orientação da cadeia principal dos resíduos I248 e L249 permitindo a estabilização da α -hélice 11 na região conhecida como *gate loop* nas demais PNPs. A formação dessa α -hélice, gera diversas mudanças conformacionais, em especial nos resíduos E203, N245 e D250. A nova conformação do resíduo D250 permite a interação do grupo NH com o grupo OH da cadeia lateral do resíduo N245, possibilitando que o grupo NH do resíduo N245 interaja com a amina dos ligantes no sítio sem a necessidade da inversão da sua cadeia lateral. Esses fatores, parecem ser a explicação para a catálise tanto de adenosina quanto de citidina. A outra substituição de grande relevância, é a L118A, a presença de uma leucina na posição 118 impede o movimento no *loop* fosfato, travando-o na conformação fechada.

Os dados bioquímicos gerados neste trabalho, vão além dos objetivos inicialmente proposto, que visava analisar e caracterizar a atividade fosforolítica das nucleosídeos fosforilase da via de salvação de purinas. Constatou-se a participação da *SmPNP2* também na via de salvação de pirimidinas, o que nos leva a concluir que não se trata de uma isoforma, mas sim, de uma nova proteína atuante na via de salvação de pirimidinas, uma via que possui escasso estudo.

O conhecimento da estrutura tridimensional e dos mecanismos catalíticos das enzimas *SmMTAP* e *SmPNP2*, mesmo que de forma preliminar, abre novas perspectivas na busca por fármacos realmente eficazes e específicos, além de contribuir de forma significativa para o aumento do conhecimento científico global da esquistossomose mansônica, uma das 17 NTDs.

6 PERSPECTIVAS

Diversas constatações foram feitas a partir dos resultados gerados neste trabalho. A partir dessas recentes observações abre-se um amplo campo para novas investigações, como:

- Obtenção da estrutura tridimensional da enzima *SmMTAP* com novos ligantes e/ou inibidores;
- Realização de ensaios de inibição enzimática para a *SmMTAP*;
- Realização de mutagênese dupla para as substituições N87T/Q289L e S12T/Q289L para a enzima *SmMTAP*.
- Caracterizar estruturalmente e bioquimicamente os novos mutantes da enzima *SmMTAP*.
- Obtenção da estrutura tridimensional da enzima *SmPNP2* com novos ligantes e/ou inibidores;
- Realização de ensaios de inibição enzimática para a *SmPNP2*;
- Realização de ensaios enzimáticos para avaliação do produto por HPLC, para constatar ou descartar atividade enzimática da *SmPNP2* para outros substratos, em especial os demais nucleosídeos pirimidínicos.
- Realização de mutagênese sítio dirigida para as substituições em relação à *SmPNP1*, encontradas no sítio ativo da *SmPNP2*, a fim de investigar e determinar os fatores evolutivos que permitem à *SmPNP2* catalisar citidina e adenosina.
- Caracterizar estruturalmente e bioquimicamente os mutantes da enzima *SmPNP2*.

REFERENCIAS

- 1 CARVALHO, O. D. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2008
- 2 KASTNER, M. R. Q. D. et al. Estudo morfológico do *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 encontrado na espécie humana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.9, n.5, p.247-261, 1975.
- 3 LOVERDE, P. T. et al. *Schistosoma mansoni* male-female interactions. **Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie**, v.82, n.2, p.357-374, Feb. 2004.
- 4 SECOR, W. E.; D. G. COLLEY. **Schistosomiasis**. Boston: Springer Science + Business Media Inc., 2005. v.10.
- 5 LABORATORY IDENTIFICATION OF PARASITIC DISEASES OF PUBLIC HEALTH CONCERN. **Schistosomiasis Infection**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/>>. Acesso em: 4 Abr. 2016.
- 6 BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância da esquistossomose mansoni**: diretrizes técnicas. 4.ed. Brasília, 2014. 144 p.
- 7 REY, L. **Bases da parasitologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.344-353.
- 8 JORDAN, P. **Schistosomiasis: the St Lucia project**. Melbourne: syndicate of the University of Cambridge. 1985
- 9 FALCÃO, E. D. C. **Pirajá da Silva**: o incontestável descobridor do *Schistosoma mansoni*. Brasília: Ministério da Saúde. 2008. 344 p.
- 10 BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância em Saúde**: dengue, esquistossomose, hanseníase, malária, tracoma e tuberculose. Brasília - DF. 2008. 195 p. (Caderno de Atenção Básica)
- 11 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**: fact sheet 115. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>> Acesso em: 20 mar. 2016.
- 12 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **PCT databank - Schistosomiasis**. Geneva. 8: 91, 93-114 p. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/databank/en/>. Acesso em: 20 mar. 2016.
- 13 CISTICID®PRAZIQUANTEL. Farmacêutica Responsável: Fernanda P. Rabello - CRF-RJ nº 16979 Merck S.A. Bula de Remédio. 2015.
- 14 CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.195, n.1, p.23-9, June 2014.

- 15 ISMAIL, M. et al. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, n.2, p.214-218, Aug 1996.
- 16 KLOETZEL, K. [On the advantage of chemotherapy of schistosomiasis in a population in continuous contact with the foci. (Preliminary note)]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.5, p.106-10, Mar-Apr. 1963.
- 17 STELMA, F. F. et al. Efficacy and side-effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma-mansoni*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.2, p.167-170, Aug. 1995.
- 18 DOENHOFF, M. J.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 4, n. 2, p.199-210, Apr. 2006
- 19 LIANG, Y. S. et al. Studies on resistance of *Schistosoma* to praziquantel XIII resistance of *Schistosoma japonicum* to praziquantel is experimentally induced in laboratory. **Chinese Journal of schistosomiasis control**, v.23, n.6, p.605-10, Dec. 2011.
- 20 PINTO-ALMEIDA, A. et al. The Role of Efflux Pumps in *Schistosoma mansoni* Praziquantel Resistant Phenotype. **PLOS One**, v. 10, n. 10, p. e0140147, 2015.
- 21 FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis - resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma-mansoni* in mice Is Drug-Specific. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, n.1, p.83-88, July 1994.
- 22 SENFT, A. W. et al. Purine metabolism in *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v.2, n.2, p.249-60, June 1972.
- 23 EL KOUNI, M. H.; CHA, S. Metabolism of adenosine analogues by *Schistosoma mansoni* and the effect of nucleoside transport inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, v.36, n.7, p.1099-106, Apr. 1987.
- 24 SENFT, A. W. et al. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. 3. Identification of enzymes in cell-free extracts. **Biochemical Pharmacology**, v.22, n.4, p.449-58, Feb. 1973.
- 25 DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Purine salvage in *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.11, p.157-67, Apr. 1984.
- 26 SENFT, A. W.; CRABTREE, G. W. Purine metabolism in the schistosomes: potential targets for chemotherapy. **Pharmacology & Therapeutics Journal**, v.20, n.3, p.341-56, 1983.
- 27 CRABTREE, G. W.; SENFT, A. W. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. V. Adenosine cleavage enzyme and effects of purine analogues on adenosine metabolism in vitro. **Biochemical Pharmacology**, v.23, n.3, p.649-60, Feb. 1974.

- 28 MIECH, F. P.; SENFT, A. W.; SENFT, D. G. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*--VI adenosine phosphorylase. **Biochemical Pharmacology**, v.24, n.3, p.407-11, Feb. 1975.
- 29 SENFT, A. W.; SENFT, D. G.; MIECH, R. P. Pathways of nucleotide metabolism in *Schistosoma mansoni*. II. Disposition of adenosine by whole worms. **Biochemical Pharmacology**, v.22, n.4, p.437-47, Feb. 1973.
- 30 DOVEY, H. F.; MCKERROW, J. H.; WANG, C. C. Action of tubercidin and other adenosine analogs on *Schistosoma mansoni* schistosomules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.16, n.2, p.185-98, Aug. 1985.
- 31 SOUZA, J. R. T. **Determinação estrutural e funcional da enzima 5'-deoxi-5'-metiltioadenosina Fosforilase de *Schistosoma mansoni***. 2012. 92 p. (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 32 SAVARESE, T. M.; EL KOUNI, M. H. Isolation and substrate specificity of an adenine nucleoside phosphorylase from adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.194, n.1-2, p.44-7, Mar-Apr. 2014.
- 33 VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, v.35, n.2, p.148-57, Oct. 2003.
- 34 VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Use of a 44k oligoarray to explore the transcriptome of *Schistosoma mansoni* adult worms. **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 3, p. 236-45, Nov. 2007.
- 35 PEREIRA, H. M. et al. Adenosine binding to low-molecular-weight purine nucleoside phosphorylase: the structural basis for recognition based on its complex with the enzyme from *Schistosoma mansoni*. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v.66, pt 1, p.73-9, Jan. 2010.
- 36 WILLIAMS-ASHMAN, H. G.; SEIDENFELD, J.; GALLETTI, P. Trends in the biochemical pharmacology of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. **Biochemical Pharmacology**, v.31, n.3, p.277-88, Feb. 1982.
- 37 KOSZALKA, G. W.; KRENITSKY, T. A.. 5'-Methylthioadenosine (MTA) phosphorylase from promastigotes of *Leishmania donovani*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.195, pt B, p.559-63, 1986.
- 38 SAVARESE, T. M.; HARRINGTON, S.; EL KOUNI, M. H. Adenine nucleoside phosphorylase and purine nucleoside phosphorylase in *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Cell Biology**, v.107, p.396a, 1989.
- 39 MILLER, R. L.; SABOURIN, C. L.; KRENITSKY, T. A. *Trypanosoma cruzi* adenine nucleoside phosphorylase. Purification and substrate specificity. **Biochemical Pharmacology**, v.36, n.4, p.553-60, Feb. 1987.

- 40 GHODA, L. Y. et al. Substrate specificities of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from *Trypanosoma brucei brucei* and mammalian cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.27, n.2-3, p.109-18, Jan. 1988.
- 41 PEGG, A. E.; WILLIAMS-ASHMAN, H. G. Phosphate-stimulated breakdown of 5'-methylthioadenosine by rat ventral prostate. **Biochemical Journal**, v.115, n.2, p.241-7, Nov. 1969.
- 42 SINGH, V. et al. Picomolar transition state analogue inhibitors of human 5'-methylthioadenosine phosphorylase and X-ray structure with MT-immucillin-A. **Biochemistry Journal**, v.43, n.1, p.9-18, Jan. 2004.
- 43 ALBERS, E. Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. **IUBMB Life**, v.61, n.12, p.1132-42, Dec. 2009.
- 44 APPLEBY, T. C.; ERION, M. D.; EALICK, S. E.. The structure of human 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase at 1.7 Å resolution provides insights into substrate binding and catalysis. **Structure Journal**, v.7, n.6, p.629-41, June 1999.
- 45 SLOMINSKA, E. M. et al. The role of 5'-deoxy-5'-methyl thioadenosine phosphorylase in cardiac adenosine breakdown and adenine production. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.486, p.159-62, 2000.
- 46 ERION, M. D. et al. Purine nucleoside phosphorylase. 1. Structure-function studies. **Biochemistry Journal**, v.36, n.39, p.11725-34, Sept. 1997.
- 47 PEREIRA, H. M. et al. Cloning, expression and preliminary crystallographic studies of the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*. **Acta Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v.59, pt. 6, p.1096-9, June 2003.
- 48 PEREIRA, H. D. et al. Structures for the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* causal agent of schistosomiasis. **Journal of Molecular Biology**, v.353, n.3, p.584-99, Oct. 2005.
- 49 PEREIRA, H. M. et al. Adenosine binding to low-molecular-weight purine nucleoside phosphorylase: the structural basis for recognition based on its complex with the enzyme from *Schistosoma mansoni*. **Acta Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v.66, pt.1, p.73-9, Jan. 2010.
- 50 BUCKOREELALL, K.; WILSON, L.; PARKER, W. B.. Identification and characterization of two adenosine phosphorylase activities in *Mycobacterium smegmatis*. **Journal Bacteriology**, v.193, n.20, p.5668-74, Oct. 2011.
- 51 WINTER, G. xia2: an expert system for macromolecular crystallography data reduction. **Journal of Applied Crystallography**, v.43, n.1, p.186-190, 2009.
- 52 KABSCH, W. Xds. **Acta Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v.66, pt 2, p.125-32, Feb. 2010.

- 53 MCCOY, A. J. et al. Phaser crystallographic software. **Journal of Applied Crystallography**, v.40, pt 4, p.658-674, Aug. 2007.
- 54 ADAMS, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v.66, pt 2, p.213-21, Feb. 2010.
- 55 EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallographica D: biological crystallography**, v.60, pt 12 pt 1, p.2126-32, Dec. 2004.
- 56 BRUNGER, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. **Nature**, v.355, n.6359, p.472-5, Jan. 1992.
- 57 DAVIS, I. W. et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.Web Server issue, p.W375-83, July 2007.
- 58 ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted Escherichia coli strain. **Microbial Cell Factories**, v.8, p.41, 2009.
- 59 NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. **Nature Protocols**, v.2, n.9, p.2212-2221, 2007.
- 60 SORRELL, F. J. et al. Development of a differential scanning fluorimetry based high throughput screening assay for the discovery of affinity binders against an anthrax protein. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, p.802–808, 2010.
- 61 JAFFE, J. J. et al. Antischistosomal activity of tubercidin in monkeys. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.22, n.1, p.62-72, Jan. 1973.
- 62 COPELAND, R. A. **Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**. New York: Wiley-VCH Inc, 2000. 390 p.
- 63 SCHOMBURG, D. et al. BRENDA, the enzyme information system in 2011. **Nucleic Acids Research**, v.39, p.D670-D676, Jan. 2011.
- 64 EL KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & Therapeutics Journal**, v.99, n.3, p.283-309, Sept. 2003.
- 65 FABIANOWSKA-MAJEWSKA, K. et al. Substrate specificity of methylthioadenosine phosphorylase from human liver. **Acta Biochimica Polonica Journal**, v.41, p.391-395, 1994.
- 66 RAGIONEL, F. D. et al. Purification and characterization of 5'-Deoxy-5'-methylthioadenosine phosphorylase from human placenta. **The Journal of Biological Chemistry**, v.261, n.26, p.12324-12329, 1986.
- 67 PAUL, D. et al. Glycol formation in crystals of uridine phosphorylase. **Biochemistry Journal**, v.49, n.16, p.3499-509, Apr. 2010.

- 68 BZOWSKA, A. Calf spleen purine nucleoside phosphorylase: complex kinetic mechanism, hydrolysis of 7-methylguanosine, and oligomeric state in solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1596, n.2, p.293-317, Apr. 2002.
- 69 KLINE, P. C.; SCHRAMM, V. L. Purine nucleoside phosphorylase. Inosine hydrolysis, tight binding of the hypoxanthine intermediate, and third-the-sites reactivity. **Biochemistry Journal**, v.31, n.26, p.5964-73, July 1992.
- 70 GORREC, F. The MORPHEUS protein crystallization screen. **Journal Applied Crystallography**, v.42, pt 6, p.1035-1042, Dec. 2009.
- 71 RUPP, B. **Biomolecular crystallography**: principles, practice, and application to structural biology. New York: Garland Science, 2010.
- 72 DAVIS, I. W. et al. MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.Web Server issue, p.W615-9, July 2004.
- 73 RAMACHANDRAN, G. N.; RAMAKRISHNAN, C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. **Journal of Molecular Biology**, v.7, p.95-9, July 1963.
- 74 KLEYWEGT, G. J.; JONES, T. A.. Phi/psi-chology: Ramachandran revisited. **Structure Journal**, v.4, n.12, p.1395-400, Dec. 1996.
- 75 LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.51, n.10, p.2778-86, Oct. 2011.
- 76 CASTILHO, M. S. et al. Structural basis for selective inhibition of purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*: kinetic and structural studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, n.4, p.1421-7, Feb. 2010.
- 77 EALICK, S. E. et al. Application of crystallographic and modeling methods in the design of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, n.24, p.11540-4, Dec. 1991.
- 78 BERROW, N. S. et al. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.6, p.e45, 2007.
- 79 LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z.. Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. **Chemistry & Biology**, v.3, n.10, p.791-801, Oct. 1996.
- 80 LEAVITT, S.; FREIRE, E.. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. **Current Opinion in Structural Biology**, v.11, n.5, p.560-566, 2001.
- 81 TODD, M. J.; GOMEZ, J.. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? **Analytical Biochemistry**, v.296, n.2, p.179-87, Sept. 2001.

- 82 FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAURNE, M. Isothermal titration calorimetry. **Analytical Chemistry**, v.62, n.18, p.950A-959A, 1990.
- 83 KALCKAR, H. M. Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes; determination of hydroxypurine compounds. **The Journal Biological Chemistry**, v.167, n.2, p.429-43, Feb, 1947.
- 84 D'MUNIZ PEREIRA, H.; OLIVA, G.; GARRATT, R. C. Purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* in complex with ribose-1-phosphate. **Journal Synchrotron Radiation**, v.18, n.1, p.62-5, Jan. 2011.
- 85 EL KOUNI, M. H.; NAGUIB, F. N. Pyrimidine salvage pathways in adult *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, v.20, n.1, p.37-44, Feb. 1990.
- 86 WISHART, D. S. et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Research**, v.41, n.Database issue, p.D801-7, Jan. 2013.
- 87 STOECKLER, J. D. et al. Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes: physicochemical properties of the crystalline enzyme. **Biochemistry Journal**, v.17, n.2, p.278-83, Jan. 1978.
- 88 PORTER, D. J. Purine nucleoside phosphorylase: kinetic mechanism of the enzyme from calf spleen. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.11, p.7342-51, Apr. 1992.
- 89 MALVERN INSTRUMENTS LIMITED. **The use of ITC for obtaining enzyme kinetic constants**. Worcestershire, UK, 2015.
- 90 BZOWSKA, A.; KULIKOWSKA, E.; SHUGAR, D. Purine nucleoside phosphorylases: properties, functions, and clinical aspects. **Pharmacology & Therapeutics**, v.88, n.3, p.349-425, Dec. 2000.
- 91 MITSUI CHEMICALS INC. Tadashi Araki et al. **Method for producing cytosine nucleoside compounds**. US6858721B2, 22 Feb. 2005.
- 92 ZHOU, X. et al. Recombinant purine nucleoside phosphorylases from thermophiles: preparation, properties and activity towards purine and pyrimidine nucleosides. **The FEBS Journal**, v.280, n.6, p.1475-90, Mar. 2013.
- 93 MAYNES, J. T. et al. Design of an adenosine phosphorylase by active-site modification of murine purine nucleoside phosphorylase. Enzyme kinetics and molecular dynamics simulation of Asn-243 and Lys-244 substitutions of purine nucleoside phosphorylase. **Biochemical Journal**, v.344, Pt 2, p.585-92, Dec. 1999.
- 94 STOECKLER, J. D. et al. Purine nucleoside phosphorylase. 3. Reversal of purine base specificity by site-directed mutagenesis. **Biochemistry Journal**, v.36, n.39, p.11749-56, Sept. 1997.
- 95 HUTCHINSON, E.G.; THORNTON, J.M. PROMOTIF: a program to identify and analyse structural motifs in protein. **Protein Science**, v. 5, n. 2, p. 212-220, Feb. 1996.

- 96 PDBsum generate: a database of the known 3d structures of proteins and nucleic acids. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/>>. Acesso em: 15 jun. 2004.
- 97 XU, T. et al. Revealing parasite influence in metabolic pathways in apicomplexa infected patients. **BMC Bioinformatics**, v.11, Suppl. 11, p.S13, Dec. 2010.
- 98 LOGAN-KLUMPLER, F. J. et al. GeneDB: an annotation database for pathogens. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.D1, p.D98-D108, Jan. 2012.
- 99 WEAVER, R. H. Nucleoside diphosphokinases. **The Enzymes**, v.6, p.151-160, 1962.
- 100 MOURAD, N.; PARKS Jr., R. E. Erythrocytic nucleoside diphosphokinase. II. Isolation and kinetics. **The Journal of Biological Chemistry**, v.241, n.2, p.271-8, Jan. 1966.
- 101 DUMAS, C. et al. X-ray structure of nucleoside diphosphate kinase. **The EMBO Journal**, v.11, n.9, p.3203-8, Sept. 1992.
- 102 PARKS Jr, R. E. et al. Purine metabolism in primitive erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.45, n.2, p.355-64, June 1973.
- 103 TRANSTRUM, M. K.; HANSEN, L. D.; C. Quinn. Enzyme kinetics determined by single-injection isothermal titration calorimetry. **Methods Journal**, v.76, p.194-200, Apr. 2015.
- 104 GONIN, P. et al. Catalytic mechanism of nucleoside diphosphate kinase investigated using nucleotide analogues, viscosity effects, and X-ray crystallography. **Biochemistry Journal**, v.38, n.22, p.7265-72, June 1999.
- 105 LECROISEY, A. et al. Phosphorylation mechanism of nucleoside diphosphate kinase: 31P-nuclear magnetic resonance studies. **Biochemistry Journal**, v.34, n.38, p.12445-50, Sept. 1995.
- 106 KUBY, S. A. et al. Studies on yeast nucleoside triphosphate-nucleoside diphosphate transphosphorylase (nucleoside diphosphokinase). IV. Steady-state kinetic properties with thymidine nucleotides (including 3'-azido-3'-deoxythymidine analogues). **Enzyme**, v.45, n.1-2, p.1-13, 1991.
- 107 BOURDAIS, J. et al. Cellular phosphorylation of anti-HIV nucleosides. Role of nucleoside diphosphate kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.14, p.7887-90, Apr. 1996.
- 108 DE CLERCQ, E. HIV inhibitors targeted at the reverse transcriptase. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.8, n.2, p.119-34, Feb. 1992.
- 109 LUA, R. C.; LICHTARGE, O. PyETV: a PyMOL evolutionary trace viewer to analyze functional site predictions in protein complexes. **Bioinformatics**, v.26, n.23, p.2981-2, Dec. 2010.

APÊNDICE A - Enzima Nucleosídeo Difosfato Kinase de *S. mansoni*

Durante o doutorado, realizou-se também a determinação funcional e estrutural da enzima Nucleosídeo difosfato kinase de *Schistosoma mansoni*. Uma breve introdução, os materiais utilizados, e os resultados obtidos são descritos e discutidos a seguir.

A.1 Introdução

No genoma de *S. mansoni*, estão depositadas 7 diferentes sequências para a enzima Nucleosídeo difosfato kinase (EC 2.7.4.6), as duas sequências com maior similaridade entre si, são as sequências Sm_092750 (*SmNDPK*) e Sm_146210 (*SmNDPK 2*) com 54% de identidade entre si. Mesmo sendo as duas sequências mais próximas, essa porcentagem de similaridade é considerada baixa para duas isoformas.

A *NDPK* catalisa a transferência reversível do grupo γ -fosforil de um nucleosídeo trifosfato para um nucleosídeo difosfato (99), apresenta pouca especificidade para as diferentes bases nucleotídicas, podendo utilizar purinas e pirimidinas. Isto lhe confere um importante papel na manutenção e equilíbrio de todos os níveis de oxi- e deoxinucleosídeo trifosfato na célula. (100-101) *Senft et al.* (24), mostra em seu trabalho, um aumento significativo na atividade da enzima *SmNDPK* em comparação com as demais enzimas na via de salvação de purinas em *S. mansoni*, indicando que essa enzima atua de forma concisa tanto na produção de ATP quanto na produção de GTP. Apesar disto, devida à abundância de ATP nas células o doador de fosfato na reação é em geral o ATP mesmo quando a reação envolve os demais nucleosídeos. A catálise ocorre através da interação com um resíduo de histidina altamente conservado no sítio ativo, usando um mecanismo chamado de "*ping-pong*". (102) Já a isoforma 2, não possui seu papel biológico bem caracterizado, uma vez que a similaridade entre as duas isoformas é baixa, as funções atribuídas para *SmNDPK* não podem ser atribuídas para *SmNDPK2*.

As estruturas tridimensionais da *NDPK-A* e *NDPK-B* de humano foram determinadas, e ambas são hexâmeros e podem ser vistas como 2 trímeros ou 3 dímeros. A *SmNDPK* possui PI teórico de 7,74, seu peso molecular é de ~16 KDa, são encontrados 149 resíduos e possui apenas 27,1% de identidade com a *NDPK-A* e 26,1% com a *NDPK-B*, ambas de humano. Já a *SmNDPK 2* possui PI teórico de 6,5, seu peso molecular é de ~23,4 KDa com 207 aminoácidos, possui 23% de similaridade com a *NDPK-A* e 26% com a *NDPK-B*, também ambas de humano.

A.2 Materiais e métodos

A.2.1 Amplificação da ORF da *SmNDPK*

A ORF do gene da *SmNDPK* foi amplificada por PCR, utilizando a enzima *PhusionTM Flash High-Fidelity*. A reação foi feita em termociclador, sendo que o anelamento foi feito a 60 °C por 5 minutos e a extensão, a 72 °C por 1 minuto (1 minuto/kbp). Após a reação completa, verificou-se a amplificação por eletroforese em gel de agarose 1,25% corado com SYBR[®]Safe DNA Stain (Invitrogen).

Uma vez verificado o produto da amplificação em gel de agarose, o DNA metilado foi digerido pela ação de 5U da enzima DpnI, a digestão ocorreu a 37 °C por 1 hora. Foi utilizado um sistema de purificação por interação magnética utilizando o kit Agencourt AMPure magnetic-bead (Beckman Coulter) segundo instruções do fabricante.

A.2.2 Ligação do produto de PCR em vetor pOPIN e transformação de células de propagação

Depois do inserto ser purificado, este foi ligado ao vetor pOPINF (78), que produz a proteína em fusão com uma cauda de histidinas ligada ao N-terminal. O inserto foi inserido no vetor através da ação da enzima *In-Fusion*. Em uma placa de PCR foi adicionado 100 ng do vetor linearizado, acrescentou-se de 10 a 250 ng do inserto purificado e ajustou-se o volume com água. 10 µl dessa solução foram transferidos para o kit *In-Fusion[®] HD Cloning Kits* (Clontech) contendo a enzima *In-Fusion* liofilizada. A placa foi mantida a 42 °C por 30 minutos.

Após a ligação do inserto, o vetor foi utilizado para transformar bactérias de propagação competentes *E.coli* OmniMax[®] II (Invitrogen). As células foram mantidas por 30 minutos no gelo na presença do vetor ligado ao inserto, posteriormente foram submetidas a um choque térmico (30 segundos a 42 °C retornando imediatamente ao gelo). Após o choque térmico foi adicionado 300 µl de meio *SOC* - Invitrogen (sem antibiótico), e então as células foram incubadas a 37 °C por 1 hora a 125 rpm. Terminado o período de incubação, as bactérias foram plaqueadas em LB ágar contendo 50 µg/mL de carbenicilina, 0,02% de X-Gal e 1 mM de IPTG. Este processo foi realizado em duplicata, e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

A.2.3 Escolha das colônias e transformação de células de expressão.

Observou-se o crescimento de colônias isoladas brancas e azuis. Colônias azuis são derivadas de bactérias cujo plasmídeo não é recombinante e por isso foram escolhidas duas

colônias brancas. Essas colônias foram transferidas para blocos (ABgene AB-0932) que continham 1,2 mL de meio PowerBroth™ suplementado com 50 µg/mL de carbenicilina. Os blocos foram vedados com adesivo poroso (ABgene AB-0718) e mantidos a 37 °C por 16 horas sob agitação.

No dia seguinte, a cultura nos blocos foi centrifugada e submetida à extração de DNA plasmidial usando o sistema robotizado *TheOnyx*. Para confirmar a presença do inserto no vetor, foi realizada uma PCR com a enzima *Phusion™ Flash High-Fidelity* usando *primers* específicos para os vetores pOPIN. A reação foi feita em termociclador, sendo que a temperatura de anelamento foi 60 °C por 30 segundos e a temperatura de extensão foi 68 °C por 2 minutos (2 minutos por kbp).

O produto da reação foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen). Após confirmação do inserto no vetor, esse foi utilizado para transformar bactérias de expressão competentes *E.coli* Rosetta2™ (DE3) (Novagen) utilizando o mesmo processo descrito para a transformação das células de propagação. Terminado o período de incubação, as bactérias foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 16 horas, em LB ágar contendo 50 µg/mL de carbenicilina, 35 µg/mL de clorafenicol. Este processo também foi realizado em duplicata.

A.2.4 Expressão e purificação da *SmNDPK*

Para a expressão da *SmNDPK*, foram feitos pré-inóculos, 20 mL para cada 1L de expressão, em meio PowerBroth™. Os meios foram suplementados com os antibióticos, 50 µg/mL de carbenicilina e 35 µg/mL de clorafenicol, e mantidos por 16 horas sob agitação a 37 °C. No dia seguinte, os pré-inóculos foram transferidos para frascos *Erlenmeyer* que foram mantidos sob agitação a 250 rpm a 37 °C de 3 a 4 horas, até que a D.O. a 595 nm fosse igual ou superior a 0,5. Neste ponto, a temperatura foi reduzida para 20 °C, e a indução da expressão foi realizada com 0,1 mM de IPTG e mantida sob agitação por 16 horas. No dia seguinte, os meios foram centrifugados por 15 minutos a 5000 g, após descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi transferido para tubos de 50 mL e armazenados a -20 °C.

Para a purificação da *SmNDPK*, foram utilizados dois diferentes protocolos, um desenvolvido pela equipe do laboratório OPPF situado no RCaH em Harwell-UK, onde as etapas descritas até aqui foram realizadas, e outro adaptado para as instalações do IFSC. No primeiro protocolo, as células foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Tris HCl pH 7,5, 500 mM NaCl, 30 mM imidazol and 0.2% Tween 20) suplementado com 25

$\mu\text{L/mL}$ do coquetel de inibidor de protease (Sigma-Aldrich®) e 400 U/mL de Dnase I. As células foram lisadas utilizando o Z cell disruptor a 30 kpsi, foram então centrifugadas e o sobrenadante imediatamente aplicadas no Äkta Xpress. O lisado foi aplicado primeiramente em uma coluna de níquel conectada a uma coluna de gel filtração (coluna His-Gel Filtration S200). A proteína + Histag foi eluída com 50 mM Tris pH7,5, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol. Frações que apresentavam alguma proteína foram coletadas para posterior análise em gel SDS PAGE.

No protocolo utilizado no IFSC, as células foram descongeladas e ressuspensas em tampão de lise (50 mM Fosfato de potássio pH 7,6, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 5 mM β mercaptoetanol) suplementado com 0,1 mM de DTT e 1 mM de PMSF. As células foram lisadas por sonicação usando 6 pulsos de 1 minutos com intervalos de 30 segundos entre eles, e novamente centrifugadas a 4700 g por 40 minutos a 4 °C, o lisado foi imediatamente aplicado em coluna de cobalto (Co-NTA agarose, Quiagen). A proteína + Histag-SUMO foi eluída com 50 mM Fosfato de potássio pH 7,6, 300 mM NaCl, 200 mM imidazol e 5 mM β mercaptoetanol), amostras de todos os passos da purificação foram analisadas por SDS-PAGE.

Em ambos os protocolos, o fragmento Histag foi clivado por incubação na presença da protease 3C (*Human rhinovirus 3C protease* – GE) a 4 °C por 16 horas. Após clivagem, a SmNDPK foi isolada por purificação reversa em coluna de níquel (Ni^{2+} -NTA, GE), quando concentrada, utilizou-se concentrador tipo Amicon®. A proteína foi dialisada em tampão fosfato (20 mM Fosfato de potássio pH 7,6, 300 mM NaCl) utilizando membrana de diálise Spectra/Por® de 14 KDa MWCO.

A.2.5 Ensaio cinético por ITC

Foram realizados cinéticos por ITC para determinar os parâmetros cinéticos da fosforilação do GDP, a partir do consumo de ATP, catalisada pela SmNDPK. Os ensaios foram realizados no equipamento VP-ITC da MicroCal Inc. (Northampton, MA) equipado com software para controle e aquisição de dados VP-Viewer. O ΔH_{app} foi determinado em um experimento separado, onde a cela de amostras foi preenchida com 2 μM de enzima e a seringa com 1 mM de ATP. Enzima e ATP, foram preparados em tampão fosfato (50 mM de fosfato de potássio, 150 mM de NaCl e 1 mM de MgCl_2) contendo 1 mM de GDP. Foi feita uma única injeção de 20 μL de ATP durante 2,5 segundos sob agitação constante de 500 rpm. O calor total envolvido na reação foi monitorado por 1200 segundos, e foi calculado pela integração da área do pico da titulação subtraindo o calor de diluição do substrato, da enzima e do tampão. (103)

Após determinada a entalpia, prosseguiu-se com os ensaios cinéticos utilizando a técnica de múltiplas injeções. Os ensaios foram realizados a 15 °C sob pressão constante, foram feitas 35 injeções, com 2,5 segundos de duração, de 1 µL de ATP a 1 mM na cela contendo enzima a 100 nM. As injeções foram intercaladas por 180 segundos sob agitação constante de 500 rpm. A concentração de ADP foi de 1 mM e estava presente tanto na cela quanto na seringa. Todos os cálculos foram feitos, utilizando-se o programa Origin 7.0 Microcal, subtraindo o calor de diluição do ATP, da enzima e do tampão.

A.2.6 Ensaios de Cristalização

Os ensaios de cristalização foram realizados nas dependências do OPPF, onde foi utilizada a técnica de difusão de vapor em “gotas sentadas” utilizando os kits de solução de cristalização Wizard™ Classic 1 e 2, Morpheus®, JCSG-*plus*™ e Index. Antes de iniciar os ensaios foi realizado um PCT (*Pre-Crystallization Test*), onde foi determinada a concentração ideal de proteína para a cristalização. Os ensaios foram realizados de forma automatizada, utilizando os robôs Hydra e o robô Cartesian. As placas foram armazenadas no Formulatrix, um sistema automatizado de estocagem de placas de cristalização. Realizou-se ensaios de co-cristalização com ADP, ATP e GDP e ensaios *soaking crystal* para os cristais obtidos na forma apo com TDP, TTP, CDP, CTP, GDP, GTP. Os cristais foram crio protegidos e enviados para coleta de dados no síncrotron DLS situado no *RCaH*. Os cristais foram crio protegidos e submetidos à difração de raios X no DLS.

A.2.7 Coleta, Processamento e refinamento das estruturas obtidas

Os conjuntos de dados foram obtidos na linha I04-1 do DLS. Para o processamento dos dados foram utilizados os programas xia2 (51) e XDS. (52) As estruturas foram determinadas no programa *Phaser* (53) por substituição molecular. Diante da baixa identidade com a NDPK humana, utilizou-se como modelo para substituição molecular a estrutura da NDPK de *Drosophila melanogaster* (PDB 1NDL) que possui 62% de identidade sequencial com a *SmNDPK*. Para o refinamento foi empregado o programa Phenix (54) e para a visualização dos mapas de densidade eletrônica e construção dos modelos, o programa COOT (55) usando os mapas de densidade eletrônica 2Fo-Fc e Fo-Fc. Para todas as estruturas obtidas, a variação do R_{Free} (56) foi usada como principal critério de validação do protocolo de refinamento e a qualidade estereoquímica do modelo foi avaliada pelo programa Molprobit. (57)

A.3 Resultados e Discussão

A.3.1 Amplificação e clonagem da *SmNDPK*

A ORF do gene da proteína *SmNDPK* foi amplificado, e o produto das amplificações foram purificados e clonados no vetor pOPINF que foi utilizado para transformar bactérias competentes *E.coli* OmniMax[®] II (Invitrogen). Os vetores foram propagados, através da cultura de bactérias e extraídos para serem submetidos à uma PCR a fim de confirmar a presença do inserto no plasmídeo. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose 1,5% corado com SYBR[®]Safe (Figura 70). Depois de confirmada a presença do inserto por PCR, os plasmídeos foram em seguida inseridos em bactérias competentes *E.coli* Rosetta2[™] (DE3) para expressão.

Figura 70 - Visualização da amplificação por PCR do inserto contendo a ORF do gene da enzima *SmNDPK* (~484 pb) a partir dos vetores extraídos de cultura de bactérias *E.coli* OmniMax[®] II (Invitrogen). **1.** Padrão de peso molecular; **2.** PCR negativo para a presença do inserto; **3.** Banda referentes à amplificação do inserto da *SmNDPK*.
Fonte: Elaborada pela autora

A.3.2 Expressão e purificação da enzima *SmNDPK*

A enzima *SmNDPK* foi expressa satisfatoriamente em meio PowerBroth[™] induzido com IPTG a 20 °C por 16 horas sob agitação, alíquotas antes e após indução foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE. Para purificação, dois protocolos foram usados, um desenvolvido pela equipe da OPPF e o outro adaptado para as instalações do IFSC. Para a purificação realizada na OPPF, a cultura foi lisada utilizando o um disruptor de células, a solução foi centrifugada e o sobrenadante aplicado no Äkta Xpress, alíquotas da proteína purificada foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 71-A). Na purificação realizada no IFSC, as células foram lisadas por sonicação e posteriormente centrifugadas, o sobrenadante foi aplicado em coluna de cobalto (Co-NTA agarose, Quiagen). A proteína foi eluída com imidazol e alíquotas de todos os passos da purificação foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 71-B), em ambos os

protocolos, a *SmNDPK* foi purificada com alto grau de pureza e rendimento de aproximadamente 12 mg por litro de expressão.

Figura 71 - Visualização da purificação da *SmNDPK* em SDS-PAGE. **A.** Purificação com protocolo da OPPF, 1 - Padrão de peso molecular; 2 - Colônia que não expressou a proteína; 3 e 4 - Frações da purificação. **B.** Purificação com protocolo adaptado para o IFSC, 1 - Padrão de peso molecular; 2 - Fração insolúvel; 3 - Eluato; 4 - Lavado e 5 - Eluição da *SmNDPK*. (Produto da purificação ~19,1 kDa).
Fonte: Elaborada pela autora

A *SmNDPK* foi expressa fusionada a um fragmento Histag que foi clivado pela ação da protease 3C (*Human rhinovirus 3C protease* – GE). Após clivagem, a *SmNDPK* foi isolada por purificação reversa em coluna de níquel (Ni^{2+} -NTA, GE).

A.3.3 Ensaio cinético por ITC

Foram realizados ensaios cinéticos para determinar os parâmetros cinéticos da fosforilação, catalisada pela *SmNDPK*, do GDP a partir de ATP. O mecanismo catalítico da enzima NDPK, ocorre em diferentes passos que são bem descritos na literatura. Cada passo é reversível e por isso o mecanismo é chamado de "*ping-pong*" e pode ser representado como: $\text{NDPK} + \text{NTP} \leftrightarrow \text{NDPK} \sim \text{NTP} \leftrightarrow \text{NDPK-P} \sim \text{NDP} \leftrightarrow \text{NDPK-P} + \text{NDP}$. (101, 104, 105) Devido à essa característica da *SmMDPK*, foi necessário realizar a injeção de ATP da maneira mais rápido possível (2,5 segundos), fazendo com que a concentração de composto aumentasse rapidamente na cela, impedindo a reversão da reação. (103) A reação catalisada pela *SmNDPK*, é uma reação endotérmica com variação entálpica de ~ 2 Kcal/mol.

O ensaio cinético foi feito usando a técnica de injeções múltiplas, assim como para a determinação do ΔH , as injeções foram feitas o mais rápido possível evitando assim a reversão

da reação. O valor dos parâmetros foi calculado, subtraindo o calor de diluição do ATP, da enzima e do tampão. Os resultados desse ensaio podem ser vistos na Figura 72.

Parâmetros cinéticos da fosforilação do GDP a partir de ATP pela ação da <i>SmNDPK</i>			
K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$V_{\text{máx}}$ (mM/s)	k_{cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
$36,3 \pm 1,6$	$0,68 \pm 0,01$	$4,9 \cdot 10^{-5}$	$19 \pm 0,003$

Figura 72 - Resultado dos ensaios cinéticos por calorimetria para a fosforilação do GDP a partir de ATP, catalisada pela *SmNDPK*. **A**, variação da potência gerada após cada injeção de ATP; **B**, ajuste de Michaelis-Menten para a fosforilação de GDP, no inserto é mostrado o calor gerado no ensaio de determinação do ΔH_{app} . À baixo, tabela contendo os valores dos parâmetros cinéticos da fosforilação do ATP.

Fonte: Elaborada pela autora

Devido a alta complexidade na reação enzimática catalisada pelas NDPKs, são poucos os dados na literatura sobre os parâmetros cinéticos da fosforilação do GDP a partir do consumo de ATP pela NDPK, para comparação dos parâmetros cinéticos obtidos nessa reação, foi utilizado o banco de dados de enzimas, o BRENDA (*BRaunschweig ENzyme DAtabase*). (63) O único valor descrito de K_M para o consumo de ATP pela NDPK humana, é de 380 μM , mas, no entanto, esse valor foi calculado para o uso de deoxy-GDP como nucleotídeo receptor. Para a utilização de GDP como receptor, é descrito o valor de K_M para o ATP de 1330 μM para a NDPK de *Rattus norvegicus* (63), esse valor é aproximadamente 37x maior que o K_M observado para *SmNDPK*, mostrando que apesar do mecanismo catalítico das NDPKs ser altamente conservado, há fatores que influenciam amplamente a afinidade enzimática por ATP. O baixo valor de K_M para o ATP, revela uma grande afinidade catalítica da *SmNDPK* para esse nucleotídeo, acentuando a ampla utilização da via de salvação de purinas pelo parasita. Não há disponível, valores de k_{cat} para o consumo de ATP utilizando GDP receptor pelas NDPKs de mamíferos, o único organismo cujo k_{cat} para essa reação é descrito, é *Mycobacterium tuberculosis*, que apresenta um k_{cat} médio de 248 s^{-1} . Esse valor é aproximadamente 364x maior que o valor de k_{cat} observado para a *SmNDPK*, o que pode justificar sua alta afinidade pelo ATP, já que o tempo de conversão é baixo. Infelizmente não é descrito nenhum valor de k_{cat}/K_M , para a reação aqui estudada, portanto, não é possível uma comparação direta da eficiência catalítica apresentada pela *SmNDPK*.

A.3.4 Cristalização e co-cristalização da *SmNDPK*

Antes de iniciar os ensaios de cristalização para a proteína *SmNDPK*, foi realizado um PCT onde foi determinada a concentração ideal de proteína para a cristalização que foi de 5 mg/mL. Para cada ensaio foram utilizados até 4 kits que continham 96 diferentes condições de cristalização. Os kits utilizados foram Wizard™ Classic 1 e 2, Morpheus®, JCSG-*plus*™ e Index. Os cristais foram crio-protegidos e submetidos à difração de raios X no DLS. Alguns dos cristais obtidos são mostrados na Figura 73.

Figura 73 - Cristais da *SmNDPK*. **1** – Cristal com a proteína na forma apoenzima; **2** – Cristal co-cristalizado com ADP; **3** – Cristal co-cristalizado com ATP e **4** – Cristal co-cristalizado com GDP.

Fonte: Elaborada pela autora

Foram obtidos 24 conjuntos de dados para a *SmNDPK*, dos quais resultaram em 3 estruturas inéditas (*SmNDPK* na forma apoenzima com grupo espacial C2, *SmNDPK* na forma apoenzima com grupo espacial P6₃22 e *SmNDPK* em complexo com ADP). A primeira estrutura obtida foi determinada por substituição molecular, utilizando a estrutura da NDPK de *Drosophila melanogaster* (PDB 1NDL) como modelo, as demais foram resolvidas também por substituição molecular, mas agora utilizando a primeira estrutura determinada da *SmNDPK*, como modelo. O refinamento foi finalizado através do programa Phenix, a estatística da coleta de dados e do refinamento, podem ser vistas na Tabela 14 abaixo. O fator de estrutura e as coordenadas das três estruturas da enzima *SmNDPK* foram depositados no banco de dados PDB.

Tabela 14 - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados para a *SmNDPK*.

	<i>SmNDPK-<i>apo</i> C2</i>	<i>SmNDPK-<i>apo</i> P6₃22</i>	<i>SmNDPK ADP</i>
<i>Coleta dos dados</i>			
Detector	PILATUS 2M	PILATUS 2M	PILATUS 2M
Parâmetros da cela (Å) a; b; c α; β; γ	211,76; 82,27; 122,37 90; 104,89; 90	71,59; 71,59; 219,44 90; 90; 120	71,45; 71,45; 219,34 90;90;120
Grupo Espacial	C121	P6 ₃ 22	P6 ₃ 22
Resolução (Å)	59,13-1,74 (1,79-1,74)	47,30-1,90 (1,95-1,90)	61,88-2,11 (2,16-2,11)
Fonte de Raios X	I04-1	I04-1	I04-1
λ (Å)	0,92	0,92	0,92
Multiplicidade	3,4 (3,3)	9,6 (10,0)	18,9 (19,6)
R _{merge} (%)	7,0 (70,4)	10,4 (70,4)	8,5 (71,0)
R _{pim} (%)	4,4 (45,9)	3,5 (23,1)	2,0 (16,4)
CC (1/2)	0,997 (0,644)	0,998 (0,846)	1,0 (0,936)
Completeza (%)	98,4 (98,3)	99,6 (99,5)	100 (100)
Número de Reflexões	695442 (49438)	261734 (19271)	379170 (28386)
Número de Rfexões únicas	204192 (15018)	27155 (1934)	20075 (1450)
I/σ	11,2 (1,9)	15,3 (3,6)	27,7 (5,1)
<i>Refinamento dos dados</i>			
n° de reflexões usadas no refinamento	204169	27125	20023
R(%) ^a	16,44	16,21	16,82
R _{free} (%) ^b	19,06	20,77	19,87
n° de átomos da proteína	14205	2372	2353
n° de átomos do ligante	0	0	54
B (Å ²)	21,60	23,07	36,28
Erro de coordenadas (ML based) (Å)	0,20	0,18	0,19
Erro de fase (°)	19,29	19,46	19,04
<i>PDB ID</i>	5IOL	5IOM	3KK8

^a $R = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$ onde $|F_c|$ é a amplitude do fator de estrutura calculado do modelo e $|F_o|$ é a amplitude do fator de estrutura observado do modelo.

^b R_{free} é calculado com base em 5% do conjunto de reflexões que não é utilizado durante o refinamento. (56)

^c Valores entre parênteses referem-se aos valores da mais alta resolução.

Fonte: Elaborada pela autora

A.3.5 Validação dos modelos

Os modelos foram avaliados e validados pelo valor do R_{free} (56) e pelo programa MolProbity. (57) Os valores de R e R_{free} , são mostrados na Tabela 14, sendo que os valores são coerentes e considerados bons em relação ao valor da resolução obtida. Os dados gerados por todas as análises do MolProbity podem ser visualizados na Tabela 15.

Tabela 15 - Análise das estruturas da *SmPNP2* gerada pelo programa MolProbity.

<i>Parâmetros Analisados</i>	<i>SmNDPK- apo C2</i>	<i>SmNDPK- apo P6322</i>	<i>SmNDPK ADP</i>	<i>Ref</i>
MolProbity score ¹	1,12	1,00	1,17	-
Clashscore ²	2,30	1,69	3,15	-
Rotâmeros ruins (%)	0,71	0,00	1,18	< 0,3%
Ramachandran outliers (%)	0,68	0,67	0,68	< 0,05%
Desvio C β > 0.25 ^a (%)	0,00	0,00	0,00	0
Res. com ligações ruins (%)	0,01	0,00	0,00	0%
Res. com ângulos ruins (%)	0,00	0,00	0,00	< 0,1%

¹ MolProbity score: combina o valor do clashscore, rotâmeros e as avaliações do Ramachandran em uma única pontuação, normalizada para estar na mesma escala que a resolução dos dados de raios X.

² Clashscore: é o número de sobreposições ruins graves (> 0,4 Å) para cada 1000 átomos.

Fonte: Elaborada pela autora

Os resíduos que apresentaram combinações não preferenciais dos ângulos ϕ e ψ (*Ramachandran outliers*) ou que apresentaram rotâmeros ruins, foram checados um a um e não apresentaram erros estruturais, os demais dados ficaram dentro do referencial proposto pelo programa. Assim os padrões analisados pelo MolProbity foram considerados ideais e, portanto, as estruturas foram validadas para análise.

A.3.6 Análise estrutural da *SmNDPK*

A substituição molecular, para a resolução da primeira estrutura da *SmNDPK* foi feita utilizando a estrutura da NDPK de *Drosophila melanogaster* (PDB 1NDL), para as demais estruturas utilizou-se a primeira estrutura da *SmNDPK* como modelo, após a substituição molecular, os modelos resultantes foram submetidos à construção automática utilizando o programa wARP/ARP, seguidos de ciclo manuais de reconstrução/ajuste e refinamento utilizando os programas Coot e Phenix. Na Figura 74 abaixo, é possível ver a densidade eletrônica do conjunto processado com a enzima na forma apo e resolução de 1,7 Å.

Figura 74 - Densidade eletrônica da estrutura da *SmNDPK1*-apo a 1,7 Å de resolução. Mapa de densidade eletrônica 2Fo-Fc contornado a 1 σ . Figura gerada no programa PyMOL.
Fonte: Elaborada pela autora

O conteúdo da unidade assimétrica foi estimado pelo Coeficiente de Matthews, indicando a presença de 2 monômeros por unidade assimétrica nas estruturas que cristalizaram com grupo espacial P₆₃22 (Figura 75-A), e 12 monômeros por unidade assimétrica para a estruturas que cristalizou com grupo espacial C2 (Figura 75-B).

Figura 75 - Conteúdo da unidade assimétrica das estruturas da *SmNDPK1*. **A.** Dímero encontrado nas estruturas com grupo espacial P₆₃22; **B.** Duplo hexâmetro encontrado na estrutura C2.
Fonte: Elaborada pela autora

A unidade funcional da *SmNDPK* é um hexâmero de subunidades idênticas, que pode ser visto como um trímero de dímeros (Figura 76-A) ou um dímero de trímeros (Figura 76-B). O dímero de trímeros possui as subunidades relacionadas por um eixo de simetria de ordem 3, que apresenta o enovelamento clássico das NDP Kinasas.

Figura 76 - Vista estrutural da unidade funcional da *SmNDPK1*. **A-** Vista do Trímero de dímeros. **B-** Vista do dímero de trímeros.

Fonte: Elaborada pela autora

As cadeias da *SmNDPK* interagem entre si através de interações entre os resíduos da superfície (Figura 77-A). Na estrutura *SmNDPK*-apo C2, os doze monômeros interagem entre si, sendo que seis deles fazem interações simultâneas com outros quatro monômeros e seis fazem interação simultânea com outros cinco monômeros. Três tipos de interações são vistos entre os doze monômeros: pontes salinas, ligações de hidrogênio e ligações não covalente (Figura 77-B).

Figura 77 - Interações entre a interface dos monômeros da *SmNDPK*, gerada pelo PDBsum generate. **A.** Esquema da interação entre os resíduos das cadeias A e B das estruturas que possuem apenas 2 moléculas por unidade assimétrica. Em vermelho, resíduos carregados negativamente; Em verde, resíduos neutro; Em cinza, resíduos alifáticos. **B.** Esquema da interação entre todas as cadeias da estrutura que possui doze moléculas por unidade assimétrica. As interações como as que ocorrem no esquema A, são observadas entre as cadeias A-C; B-F; K-E; I-J e L-G. e — Ligações não covalente; — Ligação de hidrogênio e — Ponte salina.
Fonte: Elaborada pela autora

A.3.7 Estrutura secundária, topologia e regiões conservadas

Análises da estrutura secundária e topologia da *SmNDPK* foram obtidas através do programa ProMotif (95) disponível no servidor pdbsum. (96) O monômero da *SmNDPK* consiste de um único domínio α/β , composto por 11 α -hélices, 4 fitas- β , 1 folha β , 1 β -hairpins; 1 β -bulge; 8 interações hélice-hélice; 6 β -turns e 1 γ -turns (Figura 78). Na estrutura com 12 monômeros, são observadas 5 interações hélice-hélice e 1 β -turn extras.

Figura 78 - Estrutura secundária da *SmNDPK* em função da sequência de aminoácidos gerada pelo programa ProMotif disponível no PDBsum. Símbolos: — estrutura secundária; **A** fitas β ; **H1**, **H2**, ..., numeração das α -hélices; β beta turn; γ gamma turn; β beta hairpin.
Fonte: Elaborada pela autora

Na estrutura encontra-se um β -bulge antiparalelo clássico envolvendo os resíduos V33, A34 e V174 (Figura 79-A) e um grande β -hairpin que envolve os resíduos K31, I35, V71 e E76 (Figura 79-B)

Figura 79 - Representação esquemática, gerada pelo programa ProMotif disponível no PDBsum, do β -Bulge (A) e do β -Hairpin (B) presentes na estrutura secundária da *SmNDPK*.

Fonte: Elaborada pela autora

A subunidade da *SmNDPK* apresenta, uma folha β central composta de 4 fitas β , cuja topologia é $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 1$ e $\beta 4$. A folha β central é flanqueada por 11 α hélices. Abaixo, na Figura 80, observa-se a estrutura secundária e o diagrama da topologia do monômero da *SmNDPK*.

Figura 80 - Estrutura secundária e topologia do monômero da *SmNDPK*. **A.** Representação dos elementos da estrutura secundária do monômero da *SmNDPK*. **B.** Diagrama da topologia do monômero da *SmNDPK*. Fitas são representadas por setas rosa, Hélices por cilindros vermelho e *Loops* em azul. Figura gerada pelo PDBsum generate.

Fonte: Elaborada pela autora

As NDP Kinases possuem grandes sequencias conservadas, o que por si só, já demonstra a importância catalítica dessa proteína no metabolismo dos diversos organismos (Figura 81). Em comparação com as sequencias das NPKs que possuem maior identidade sequencial com a *SmNDPK*, nota-se que todos os resíduos envolvidos na ligação direta ou indiretamente com o nucleotídeo são conservados. As maiores divergências sequenciais acontecem no N-terminal, C-terminal e entre os resíduos 37-47. Em comparação com a *HsNDPK-A*, no C-terminal, não são vistas divergências estruturais, já no N-terminal das NDPKs analisadas, a sequência adicional possibilita a formação de uma pequena α -hélice que não é vista na *SmNDPK*. A presença das substituições que acontecem na região entre os resíduos 37 e 47 ocasionam nas *HsNDPKs* uma α -hélice de 13 resíduos, enquanto na *SmNDPK*, essa região corresponde à α -hélice 3 que possui apenas 7 resíduos. São encontradas 10 substituições que acontecem exclusivamente na *SmNDPK* (*SmNDPK*:NDPKs: R27Q30; A51D54; L55R58; S56P59;

K60G63; F75W78; E82K85; Q107I110; T120V123 e H148Y151), sendo que apenas uma dessas substituições acontecem entre resíduos com radicais de mesma polaridade (F75W78).

Figura 81 - Alinhamento da NDPK de *S. mansoni* e das NDPKs de *Toxoplasma gondii*, de *Drosophila melanogaster* e humanas A e B, gerado pelo programa ESPript. As setas em preto indicam fitas β ; espirais, α -hélices; os resíduos em escritos em branco com fundo vermelho são conservados e os escritos em vermelho com fundo branco são os resíduos não conservados, mas de propriedades similares.

Fonte: Elaborada pela autora

A.3.8 Sítio ativo da *SmNDPK*

Foi obtido somente o complexo da *SmNDPK* com ADP, portanto, o sítio ativo dessa

Figura 82 - Esquema da superfície do trímero da *SmNDPK*, evidenciando os bolsões catalítico, ocupados por uma molécula de ADP.

Fonte: Elaborada pela autora

A interação do ADP no sítio ativo da *SmNDPK*, acontece entre os resíduos: K9; L52; F57; L61; T91; R102; V109 e N112, desses, apenas os resíduos K9, T91, V109 e N112 fazem interações diretamente com a molécula de ADP. Na Figura 83, está esquematizada as interações do ligante no sítio ativo da estrutura da *SmNDPK*.

Figura 83 - Diagrama LigPlot⁺ para as interações do ADP no sítio ativo da *SmNDPK*. Ligações de hidrogênio estão representadas por linhas tracejadas entre os átomos envolvidos, contatos hidrofóbicos estão representados por um arco com raios que irradiam para os átomos em contato.

Fonte: Elaborada pela autora

Os contatos entre o nucleotídeo e a enzima, são bem definidos e notavelmente conservados entre as NDPKs dos mais diferentes organismos, desde bactérias até seres humanos. As NDPKs apresentam baixa especificidade pela base, essa porção se situa em uma fenda hidrofóbica e, portanto, não realiza interações com a proteína. Assim, a base não é necessária para a ligação ou catálise, justificando portanto, a ampla especificidade de todas as NDPKs pelos diversos nucleotídeos e deoxy-nucleotídeos. (104)

Já a porção ribose, especialmente o 3'-OH, figura como parte essencial na interação do nucleotídeo no sítio ativo, ajudando na orientação dos fosfatos nos nucleotídeos tri-fosfatos. Estudos mostram que a ausência da porção 3'-OH da ribose, diminui drasticamente a eficiência catalítica da enzima. (106-107) Essa é uma característica bastante explorada nas NDPKs, sendo usada, por exemplo, na terapia anti-AIDS, através do uso de análogos de nucleosídeos. (108)

Os resíduos mostrados na Figura 83, atuam na formação do bolso catalítico e ligação do nucleotídeo, no entanto, os principais resíduos responsáveis pela atividade catalítica da enzima ficam afastados da fenda principal de ligação, esses resíduos formam a sequência HGS (H115; G116 e S117), conservada, em todas as NDPKs existentes (Figura 84).

Figura 84 - Esquema do bolso catalítico da *SmNDPK*, evidenciando as interações que ocorrem entre o ligante e os resíduos do sítio catalítico. Ao fundo, em amarelo, os resíduos da sequência HGS, responsáveis pela atividade catalítica nas NDKs.

Fonte: Elaborada pela autora

O mecanismo catalítico das NDPKs acontece através de uma sequência de eventos muito complexa, mas bem determinada, que é bem descrita e muito estudada. (101, 104-105) A ação catalítica, se inicia com a ligação do NTP doador de fosfato no bolso catalítico, localizado na superfície de cada protômero do hexâmero. A concentração de NTP na célula é o principal fator que determinará qual NTP será utilizado (devido às altas concentrações nas células, o ATP é o NTP mais utilizado como doador de fosfato). Em seguida, a histidina catalítica (H115) é fosforilada pela transferência do grupo fosfato- γ (grupo fosfato mais distante da base) resultando em um estado intermediário da enzima com a presença de uma fosfohistidina. A estabilização do grupo fosfato para formação da fosfohistidina, é auxiliada pela ação da serina S117, que ajuda a acomodar o grupo fosfato no espaço deixado pela presença da G116. O aumento na concentração de um NDP diferente daquele que está ligado no sítio catalítico, desloca o equilíbrio fazendo com o que o nucleotídeo doador deixe o sítio para a entrada de um nucleotídeo receptor. O NDP receptor recebe o grupo fosfato ligado à fosfohistidina, e deixa o sítio como um novo NTP.

Na comparação entre a estrutura da *Sm*NDPK em complexo com ADP e APO, não são observados grandes movimentos estruturais no sítio ativo (Figura 85-A). Mas através da análise estrutural, utilizando a ferramenta “*B-factor putty*” do programa PyMOL (109), foi possível analisar a variação do B-factor (Figura 85-B), que sugere que a sequência HSG fica estável enquanto a α -hélice 4 se movimenta permitindo a aproximação do grupo fosfato com a histidina H115. Como essa movimentação não é observada através da sobreposição das estruturas APO e em complexo com ADP, sugere-se que essa movimentação é extremamente rápida, e acontece somente no momento da transferência do grupo fosfato.

Figura 85 - Análise dos movimentos estruturais na *Sm*NDPK. **A.** Sobreposição das estruturas da *Sm*NDPK APO (em amarelo) e em complexo com ADP (em branco); **B.** Análise estrutural com a ferramenta “*B-factor putty*” do programa PyMOL (109), onde é possível inferir a movimentação da estrutura através do gradiente de cores e pela espessura do esquema que aumenta proporcionalmente ao aumento dos valores do B-factor.

Fonte: Elaborada pela autora

A.3.9 Comparação estrutural entre as três estruturas da *SmNDPK*

Os monômeros da *SmNDPK*, quando alinhados entre si apresentam pequenas diferenças estruturais, uma vez que a presença ou não de ligantes, não induz grandes mudanças conformacionais. Essas mudanças foram medidas pelo RMSD da sobreposição das cadeias A e B das estruturas que apresentaram duas moléculas na unidade assimétrica (*SmNDPK*-Apo-P6₃22 e ADP), juntamente com as cadeias A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K e L da estrutura que apresentou 12 moléculas na unidade assimétrica (*SmNDPK*-Apo-C2). Os resultados obtidos são mostrados abaixo nas Tabela 16 e Tabela 17.

Tabela 16 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros da estrutura *SmNDPK*-apo C2. Valores calculados pelo alinhamento no programa PyMOL.

SmNDPK-Apo											
C2 A	C2 A										
C2 B	0,135	C2 B									
C2 C	0,119	0,116	C2 C								
C2 D	0,137	0,182	0,148	C2 D							
C2 E	0,143	0,109	0,104	0,145	C2 E						
C2 F	0,134	0,106	0,109	0,173	0,096	C2 F					
C2 G	0,108	0,128	0,118	0,152	0,122	0,138	C2 G				
C2 H	0,168	0,131	0,103	0,186	0,086	0,104	0,138	C2 H			
C2 I	0,111	0,155	0,136	0,095	0,154	0,152	0,135	0,194	C2 I		
C2 J	0,171	0,142	0,125	0,194	0,097	0,109	0,170	0,082	0,168	C2 J	
C2 K	0,100	0,091	0,135	0,139	0,116	0,116	0,110	0,157	0,113	0,143	C2 K
C2 L	0,133	0,172	0,175	0,193	0,187	0,184	0,156	0,215	0,206	0,225	0,140

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 17 - Valores em Angstrom do RMSD da sobreposição dos monômeros das estrutura *Sm*NDPK-apo C2, *Sm*NDPK-apo P6322 e *Sm*NDPK-ADP. Valores calculados pelo alinhamento no programa PyMOL.

SmNDPK				
Apo P6322 A	Apo P6322 A			
Apo P6322 B	0,080	Apo P6322 B		
ADP A	0,163	0,150	ADP A	
ADP B	0,159	0,140	0,093	ADP B
Apo C2 A	0,155	0,135	0,147	0,143
Apo C2 B	0,136	0,114	0,133	0,118
Apo C2 C	0,139	0,118	0,157	0,137
Apo C2 D	0,177	0,156	0,156	0,133
Apo C2 E	0,098	0,098	0,151	0,128
Apo C2 F	0,093	0,107	0,164	0,140
Apo C2 G	0,137	0,134	0,143	0,135
Apo C2 H	0,105	0,117	0,180	0,156
Apo C2 I	0,169	0,139	0,134	0,135
Apo C2 J	0,119	0,107	0,209	0,172
Apo C2 K	0,134	0,109	0,125	0,123
Apo C2 L	0,227	0,219	0,180	0,189

Fonte: Elaborada pela autora

Através da sobreposição de todos os monômeros das três estruturas obtidas, nota-se que a posição da cadeia lateral dos resíduos é muito conservada. São observadas grandes mudanças conformacionais apenas nas cadeias laterais dos resíduos G134, Q138 e K140. O monômero B da estrutura *Sm*NDPK-apo C2, foi o que apresentou o maior número de resíduos com mudanças conformacionais exclusivas, essas mudanças acontecem somente na cadeia lateral dos resíduos F57, L129 e E121. A sobreposição dos monômeros revelou também, um leve desvio no *loop* entre os resíduos L53 e F58.

A.3.10 Comparação estrutural entre a *Sm*NDPK e a *Hs*NDPK

O monômero da *Hs*NDPK-A é muito parecido com o monômero das *Sm*NDPKs, com RMSD de 0,523 Å. Uma leve mudança conformacional é observada no N-terminal, já que na estrutura humana existe uma inserção de 3 resíduos (Figura 81). A principal diferença estrutural, acontece entre os resíduos Q111-N115 (que corresponde à sequência D108-N112 em *S. mansoni*), onde observa-se a formação de uma pequena α -helice na NDPK humana, que não é observada nas estruturas da *Sm*NDPK. Algumas substituições são observadas, embora nenhuma delas acontece no sítio catalítico ou na sequência HGS. Abaixo pode ser visualizada a sobreposição dessas estruturas (Figura 86).

Figura 86 - Sobreposição da estrutura tridimensional da *Sm*NDPK-ADP (em rosa) com a estrutura *Hs*NDPK-A (em verde) em complexo com ADP (pdb 1UCN).

Fonte: Elaborada pela autora

APÊNDICE B – Lista de Publicações Científicas

Abaixo estão listados os artigos e resumos publicados e/ou submetidos em periódicos, produzidos durante o doutorado.

Neris, D. M.; D’Muniz, H.P.; Correia, R. O.; Oliveira, S. R. P.; DeJani, N. N.; Rodolpho, J. M. A.; Souza, L. C.; Fattori, A. C. M.; ROMANELLO, L.; **Souza, J. R. T.**; Rodrigues, V.; Anibal, F. F. Evaluation of immunization with purine salvation pathway recombinant enzymes in *Schistosoma mansoni* worms and eggs in murine schistosomiasis. International Journal of Advanced Research, v. 1, p. 894-905, 2013.

Romanello, L.; **de Souza, J.**; Bird, L.; Nettleship, J.; Owens, R.; Reddivari, Y.; Brandão-Neto, J.; Pereira, H. Crystal structure of *Schistosoma mansoni* HGPRT isoform 1. Acta Crystallographica. Section A, Foundations of Crystallography, v. 70, p. C833-C833, 2014. doi.org/10.1107/s2053273314091669

Da Silva Neto, A. M.; **Torini De Souza, J. R.**; Romanello, L.; Cassago, A.; Serrão, V. H. B.; Demarco, R.; Brandão-Neto, J.; Garratt, R. C.; Pereira, H. M. Analysis of two *Schistosoma mansoni* Uridine Phosphorylases isoforms suggests the emergence of a protein with a non-canonical function. Biochimie (Paris. Print), v. 125, p. 12-22, 2016. [doi:10.1016/j.biochi.2016.02.007](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.02.007)

Serrão, V. H. B.; Romanello, L.; Cassago, A.; **de Souza, J. R. T.**; Cheleski, J.; DeMarco, R.; Brandão-Neto, J.; Pereira, H. Muniz. Structural determination and kinetics assays of Dihydrofolate Reductase from *Schistosoma mansoni* (SmDHFR). Artigo submetido ao Acta Tropica Journal em 12 de maio de 2016.

Torini, J. R.; Brandão-Neto, J.; DeMarco, R.; Pereira, H. M. Crystal Structure of *Schistosoma mansoni* Adenosine Phosphorylase / 5'-methylthioadenosine phosphorylase and its importance on adenosine salvage pathway. Artigo em fase de submissão ao PLOS ONE.

ANEXO A - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados da *SmMTAP*

	S12Tapo	S12T-Ade	S12T-MTA	N87T-Apo	N87T-Ade
Detector	Pilatus 2M	Pilatus 2M	Pilatus 2M	Pilatus 2M	Pilatus 6MF
Cell parameters (Å) a; b; c α ; β ; γ	81.44; 82.16; 150.91 90; 101.5; 90	74.46; 84.65; 75.92 90; 106.28; 90	76.81; 73.91; 81.29 90; 102.44; 90	81.19; 82.23; 150.75 90; 101.55; 90	81.49; 82.11; 150.27 90; 101.10; 90
Space Group	P 2 ₁	P 2 ₁	P 2 ₁	P 2 ₁	P 2 ₁
Resolution (Å)	39.58 - 2.06 (2.11 - 2.06)	72.88 - 2.02 (2.07 - 2.02)	49.46 - 1.95 (2.00 - 1.95)	28.05 - 1.85 (1.95 - 1.85)	76.76 - 1.66 (1.72 - 1.66)
X ray Source	I04-1	I04-1	I04-1	I04-1	I04
λ (Å)	0.92	0.92	0.92	0.92	0.9795
Multiplicity	4.2 (3.8)	4.2 (4.2)	3.9 (4.0)	5.4 (5.3)	3.8 (2.3)
R _{merge} (%)	9.4 (59.5)	8.6 (61.5)	8.9 (52.2)	8.9 (56.6)	7.3 (65.0)
R _{pin} (%)	5.2 (34.6)	7.3 (52.0)	0.79 (46.2)	6.3 (40.7)	4.7 (53.9)
CC(1/2)	0.99 (0.77)	0.99 (0.79)	0.99 (0.77)	0.99 (0.60)	0.99 (0.47)
Completeness (%)	99.8 (94.3)	99.2 (98.2 - 99.1)	96.8 (96.9)	97.5 (97.7)	99.5 (75.7)
Reflections	449950 (31460)	249705 (18323)	244597 (18337)	874609 (124104)	838202 (42414)
Unique Reflections	119129 (8332)	58891 (4347)	62658 (4658)	161035 (23481)	221276 (18113)
I/ σ	11.2 (2.4)	10.1 (2.2)	9.3 (2.2)	11.0 (2.8)	7.8 (1.1)
Reflections used for Refinement	120787	58868	62633	160675	218591
R(%)**	17.53	16.92	16.63	17.12	19.46
R _{free} (%)**	21.62	21.51	19.40	19.95	22.67
N° of protein atoms	12769	6544	6568	13039	13082
N° of ligand atoms	30	45	75	30	55
B (Å ²)	25.92	26.14	21.98	17.36	19.42
Coordinate Error (ML based) (Å)	0.23	0.25	0.18	0.17	0.23
Phase error (°)	23.40	23.30	19.61	19.99	28.0
PDB ID	5F73	5F77	5F76	5F78	5F7J

ANEXO A - Estatísticas da coleta, processamento e refinamento dos dados da *Sm*MTAP

	Q289L-Ade	Q289L-Tub	2M-apo	2M-Ade
Detector	Pilatus 2M	Pilatus 2M	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF
Cell parameters (Å) a; b; c α ; β ; γ	74.35; 81.87; 81.76 90; 101.95; 90	74.36; 81.9; 81.73 90; 102.16; 90	80.70; 82.26; 150.05 90; 101.42; 90	81.06; 82.09; 150.15 90; 101.23; 90
Space Group	P 2 ₁	P 2 ₁	P 2 ₁	P 2 ₁
Resolution (Å)	27.19 - 1.81 (1.91 - 1.81)	48.89 - 1.77 (1.82 - 1.77)	82.26 - 1.8 (1.94 - 1.80)	79.51 - 1.87 (1.92 - 1.97)
X ray Source	I04-1	I04-1	I04	I04
λ (Å)	0.92	0.92	0.9795	0.9795
Multiplicity	3.8 (3.8)	3.8 (3.7)	3.3 (3.3)	4.3 (4.4)
R _{merge} (%)	10.8 (47.3)	6.8 (48.7)	8.6 (67.0)	8.1 (92.9)
R _{sym} (%)	9.7 (42.6)	6.0 (42.9)	5.6 (43.6)	5.7 (59.1)
CC(1/2)	0.98 (0.75)	0.99 (0.75)	0.99 (0.74)	0.99 (0.53)
Completeness (%)	96.7 (97.8)	97.3 (89.6)	99.9 (99.9)	97.7 (96.6)
Reflections	318481 (46630)	348470 (22508)	593295 (111133)	176595 (49849)
Unique Reflections	83708 (12303)	90698 (6156)	178037 (36498)	155607 (11378)
I/ σ	6.5 (2.1)	10.4 (2.1)	7.1 (1.6)	10.3 (1.3)
Reflections used for Refinement	83329	90672	177099	155532
R(%)**	18.21	16.37	21.07	18.11
R _{free} (%)**	21.11	19.23	23.54	21.47
N° of protein atoms	6489	6483	12797	12921
N° of ligand atoms	15	72	30	70
B (Å ²)	15.69	20.19	21.79	26.43
Coordinate Error (ML based) (Å)	0.18	0.17	0.27	0.23
Phase error (°)	22.14	19.44	28.10	24.53
PDB ID	5F7O	5F7X	5F7Z	5FAK

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

silver ♦ bullets™ bio

Wells A1 - A12

HAMPTON
RESEARCH

Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC	Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	EC
1, 54, 62	1 (A1)	0.16% w/v	L-Citrulline	175.19	372-75-8	2067996	7, 11, 91	7 (A7)	0.16% w/v	Benzamide hydrochloride	156.61	1670-14-0
1, 88		0.16% w/v	L-Ornithine hydrochloride	168.62	3184-13-2	2216786	7, 8, 19		0.16% w/v	Acarbose	645.61	56180-94-0
1		0.16% w/v	Urea	60.06	57-13-6	2003155			0.16% w/v	Ethidium bromide	394.31	1239-45-8
1, 10		0.16% w/v	Oxalic acid	90.04	144-62-7	2056343	7, 81		0.16% w/v	Cholesterol	386.66	57-88-5
1, 83		0.16% w/v	Kanamycin monosulfate	582.58	25389-94-0	2496309	7, 19		0.16% w/v	Sarcosine	88.09	107-97-1
1, 10, 21, 42, 54, 85		0.16% w/v	L-Arginine	174.20	74-79-3	2008111	7, 48		0.16% w/v	L-Homoserine	119.12	672-15-1
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3
2, 12, 95		0.16% w/v	L-Carnitine hydrochloride	197.66	6645-46-1	2296636	8, 51		0.20% w/v	Sodium gluconate	218.14	527-07-1
2		0.16% w/v	Tartaric acid	170.122	1401-55-4	2157532	7, 8, 19		0.20% w/v	Acarbose	645.61	56180-94-0
2, 18, 92		0.16% w/v	Asparagine	294.30	22838-47-0	2452613	8, 96		0.20% w/v	D-(+)-Maltose monohydrate	360.32	6363-53-7
2, 17, 92	2 (A2)	0.16% w/v	Caffeine	194.19	58-08-2	2003621	8, 14	8 (A8)	0.20% w/v	Salicylic acid	138.12	69-72-7
2, 16		0.16% w/v	p-Coumaric acid	164.16	501-98-4		8, 16		0.20% w/v	D-(+)-Melibiose monohydrate	342.30 unhyd	585-99-9
2, 48		0.16% w/v	4-Hydroxy-L-proline	131.13	51-35-4	2000919	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	9, 11		0.20% w/v	g-Strophanthin	728.78	630-60-4
3, 64	3 (A3)	0.16% w/v	Disodium beta-Glycerophosphate tetrahydrate	216.04 unhyd	819-883-0	2124643	9, 14, 96	9 (A9)	0.20% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4
3, 5, 15		0.16% w/v	trans-Cinnamic acid	148.16	140-10-3	2053981			0.20% w/v	1,4-Diaminobutane	88.15	110-60-1
3, 17, 94		0.16% w/v	O-Phospho-L-tyrosine	261.17	21820-51-9		9, 20		0.20% w/v	D-(+)-Tetraose dihydrate	378.33	6138-23-4
3, 21		0.16% w/v	Betaine anhydrous	117.15	107-43-7	2034906	9, 80		0.20% w/v	L-α-Phosphatidylcholine		8002-43-5
3, 83		0.16% w/v	Maltoheose hydrate	504.44	207511-08-8	2141742	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3
3, 48		0.16% w/v	Cytidine	243.22	65-46-3	2006109	10		0.16% w/v	Sucrose	342.30	57-50-1
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	10, 18		0.16% w/v	Cadaverine	102.18	462-94-2
4, 14		0.16% w/v	L-Carnitine	176.18	543-38-4		10, 42, 54, 85		0.16% w/v	L-Glutamic acid	147.13	56-86-0
4, 13, 96		0.16% w/v	O-Phospho-L-serine	185.07	407-41-0	2069860	1, 10, 21, 42, 54, 85		0.16% w/v	L-Arginine	174.20	74-79-3
4		0.16% w/v	Taurine	125.15	107-35-7	2034838			0.16% w/v	Oxalic acid	90.04	144-62-7
4, 16	4 (A4)	0.16% w/v	Quinine	324.42	130-95-0	2050032	1, 10	10 (A10)	0.16% w/v	Tetrahydrolic acid	445.43	135-16-0
4, 83		0.16% w/v	Sodium glyoxylate monohydrate	114.03	2706-75-4	2202888	10, 79		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3
4, 49		0.16% w/v	Cholic acid	408.58	81-25-4	2013378	Buffer		0.20% w/v	Protamine sulfate salt		53697-25-4
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	11, 20		0.20% w/v	g-Strophanthin	728.78	630-60-4
5, 20	5 (A5)	0.08% w/v	Ellipicine	246.31	519-23-3	2082640	9, 11	11 (A11)	0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3
5, 17		0.20% w/v	Gliberellin A ₉	346.38	77-06-5	2010010	7, 11, 91		0.20% w/v	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate disodium salt	535.15	1927-31-7
3, 5, 15		0.20% w/v	trans-Cinnamic acid	148.16	140-10-3	2053981	11, 68, 90		0.20% w/v	D-Fructose 1,6-diphosphate trisodium salt octahydrate	550.18	81028-91-3
5		0.20% w/v	Phenol	94.11	108-95-2	2036327	11, 81		0.20% w/v	Oxamic acid	88.05	471-47-6
5, 82	6 (A6)	0.20% w/v	Succinic acid disodium salt hexahydrate	270.14	6106-21-4		Buffer	12 (A12)	0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	12, 26, 95		0.20% w/v	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate disodium salt	535.15	1927-31-7
6, 12		0.16% w/v	Sulfanilamide	172.20	63-74-1	2005634	12, 96		0.20% w/v	Benzidine	184.24	92-87-5
6, 21		0.16% w/v	D-(+)-Cellobiose	342.30	598-50-7	2084365	2, 12, 95		0.20% w/v	L-Carnitine hydrochloride	197.66	6645-46-1
6, 67		0.16% w/v	D-Glyceric acid calcium salt dihydrate	143.12	14029-62-7		6, 12		0.20% w/v	Sulfanilamide	172.20	63-74-1
6, 20		0.16% w/v	6-Phosphogluconic acid trisodium salt	342.08	53411-70-4	2585436	12, 28, 37, 38, 91		0.20% w/v	Cytosine	111.10	71-30-7
6, 82	6 (A6)	0.16% w/v	N _ε -Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride	342.83	2645-08-1	2201570	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3
6, 51		0.16% w/v	D-(+)-Galactosamine hydrochloride	215.63	1772-03-8	2171981						
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697						

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

silver ♦ bullets™ bio

Wells B1 - B12

**HAMPTON
RESEARCH**

Also in		Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC	Also in		Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC
13, 25, 81, 91			0.20% w/v	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate sodium salt hydrate	347.22 (univ)			19, 35, 90			0.16% w/v	Thymidine	242.23	50-89-5	2007074
13, 61			0.20% w/v	N-Acetyl-D-galactosamine	221.21	1811-31-0	2173219	18, 19, 63			0.16% w/v	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt monohydrate	369.20	37839-81-9	2533283
4, 13, 96		13 (B1)	0.20% w/v	O-Phospho-L-serine	185.07	407-41-0	2068860	7, 19	19		0.16% w/v	Sarcosine	89.09	107-97-1	2035386
13, 19, 91			0.20% w/v	4-Aminobenzoic acid	137.14	150-13-0	2057530	13, 19, 91	(B7)		0.16% w/v	4-Aminobenzoic acid	137.14	150-13-0	2057530
13, 36, 89			0.20% w/v	Uridine	244.20	58-98-8	2004075	7, 8, 19			0.16% w/v	Acarbose	645.61	56180-94-0	2600307
Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	19, 48			0.16% w/v	Inosine	268.23	58-63-9	2003904
14, 24, 91			0.16% w/v	Thymidine 5'-triphosphate sodium salt	504.15	18423-43-3		Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
4, 14			0.16% w/v	L-Canavanine	176.18	543-38-4		5, 20			0.08% w/v	Ellipticine	246.31	519-23-3	2082640
9, 14, 96		14	0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2000615	11, 20			0.20% w/v	Protamine sulfate salt		53597-25-4	
8, 14		(B2)	0.16% w/v	Salicylic acid	136.12	69-72-7	2007123	9, 20	20		0.20% w/v	D-(+)-Trehalose dihydrate	378.33	6138-23-4	2027396
14, 34, 73			0.16% w/v	2'-Deoxyguanosine hydrate	267.24 (univ)	961-07-9		6, 20	(B8)		0.20% w/v	6-Phosphogluconic acid trisodium salt	342.08	53411-70-4	2585436
14, 80			0.16% w/v	D-(+)-Raffinose pentahydrate	594.52	17629-30-0	2081469	20, 79			0.20% w/v	D-(+)-Glucose	180.16	50-99-7	2000751
Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
15, 94			0.16% w/v	Cytidine 5'-triphosphate disodium salt	527.12	36051-68-0	2528493	21			0.20% w/v	Penicillin G sodium salt	356.38	69-57-8	2007102
15, 64			0.16% w/v	Stachyose hydrate	666.58	54261-98-2	2074273	1, 10, 21, 42, 54, 85			0.20% w/v	L-Arginine	174.20	74-79-3	2008111
15		15	0.16% w/v	Cystathionine	222.26	535-34-2	2086137	6, 21	21		0.20% w/v	D-(+)-Cellulose	342.30	528-50-7	2084365
15, 16, 92		(B3)	0.16% w/v	Cystamine dihydrochloride	225.20	56-17-7	2002607	21, 77, 94	(B9)		0.20% w/v	Pyridoxamine dihydrochloride	241.11	524-36-7	2083576
3, 5, 15			0.16% w/v	trans-Cinnamic acid	148.16	140-10-3	2053981	3, 21			0.20% w/v	Betaine anhydrous	117.15	107-43-7	2034906
15, 17, 62			0.16% w/v	Inosine 5'-monophosphate disodium salt	392.17	362195-40-5	2251464	Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	17, 22			0.20% w/v	Nicotinic acid	123.11	59-67-6	2004410
16, 27			0.20% w/v	Uridine 5'-diphosphate sodium salt	404.16	21931-53-3		22, 31, 88	22		0.20% w/v	Adenosine	267.24	58-61-7	2003899
4, 16			0.20% w/v	Quinine	324.42	130-95-0	2050032	22, 33, 44, 54, 66, 85, 93	(B10)		0.20% w/v	L-Tyrosine	181.19	60-18-4	2004604
2, 16		16	0.20% w/v	p-Coumaric acid	164.16	501-98-4		22, 35			0.20% w/v	Xanthine	152.11	69-89-6	2007186
8, 16		(B4)	0.20% w/v	D-(+)-Melibiose monohydrate	342.30 (univ)	585-99-9	2095686	22, 41			0.20% w/v	L-Lactic acid	90.08	79-33-4	2011962
15, 16, 92			0.20% w/v	Cystamine dihydrochloride	225.20	56-17-7	2002607	22, 41			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer			0.25% w/v	2'-Deoxyadenosine monohydrate	269.26	16373-93-6	2134887
17, 22			0.20% w/v	Nicotinic acid	123.11	59-67-6	2004410	23, 32			0.20% w/v	N-Acetylneuraminic acid	309.27 (univ)	131-48-6	2050231
15, 17, 62		17	0.20% w/v	Inosine 5'-monophosphate disodium salt	392.17	362195-40-5	2251464	23, 36, 56, 93	23		0.20% w/v	N-p-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone	351.85	402-71-1	2069546
5, 17		(B5)	0.20% w/v	Gibberellin A ₃	346.38	77-06-5	2010010	23, 38, 95	(B11)		0.20% w/v	α-D-Glucose 1-phosphate disodium salt hydrate	304.10 (univ)	56401-20-8	2601541
3, 17, 94			0.20% w/v	O-Phospho-L-tyrosine	261.17	21820-51-9		23, 78			0.20% w/v	Fumaric acid	116.07	110-17-8	2037430
2, 17, 92		(B6)	0.20% w/v	Caffeine	194.19	58-08-2	2003621	Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	14, 24, 91			0.25% w/v	Thymidine 5'-triphosphate sodium salt	504.15	18423-43-3	
18, 19, 63			0.20% w/v	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt monohydrate	369.20	37839-81-9	2533283	24, 34	24		0.25% w/v	α-Ketoglutaric acid disodium salt	190.06	305-72-6	2061678
10, 18		18	0.20% w/v	Cadaverine	102.18	462-94-2	2073290	24, 36	(B12)		0.25% w/v	2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside	301.25	369-07-3	2067161
18, 65			0.20% w/v	D-(+)-Maleitose hydrate	504.44 (univ)	207511-10-2	2098949	24, 78			0.25% w/v	cis-Aconitic acid	174.11	585-84-2	2095644
2, 18, 92			0.20% w/v	Aspartame	294.30	22839-47-0	2452613	Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
18, 33, 90			0.20% w/v	Guanosine	283.24	118-00-3	2042278								
Buffer			0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697								

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

silver ♦ bullets™ bio

Wells C1 - C12

**HAMPTON
RESEARCH**

Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC	Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC
13, 25, 81, 91		0.20% w/v	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate sodium salt hydrate	347.22 (anhyd)			22, 31, 88		0.20% w/v	Adenosine	267.24	58-61-7	2003899
25, 39, 40	25	0.20% w/v	Ethanolamine	61.08	141-43-5	2054833	28, 31		0.20% w/v	Pepstatin A	685.91	26305-03-3	2476000
25, 39	(C1)	0.20% w/v	Theophylline	180.17	58-55-9	2003857	30, 31, 69	31	0.20% w/v	(±) Epinephrine	183.21	329-65-7	2063476
25, 38		0.20% w/v	Isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside	238.30	367-93-1	2067030	27, 31, 96	(C7)	0.20% w/v	Sodium phenyl phosphate dibasic dihydrate	254.09	66778-08-3	2219174
25, 78		0.20% w/v	Oxalacetic acid	132.07	328-42-7	2063298	31, 72		0.20% w/v	Sodium 5'-triphosphate trisodium salt	574.11	35908-31-7	
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	Inosine 5'-triphosphate triphosphate	260.29	75277-39-3	2781697
12, 26, 95		0.20% w/v	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate disodium salt	535.15	1927-31-7	2176623	23, 32		0.20% w/v	2'-Deoxyadenosine monohydrate	269.26	16373-93-6	2134887
26, 33, 55, 94		0.20% w/v	D-Glucose 6-phosphate sodium salt	282.12	54010-71-8	2589210	29, 32		0.20% w/v	O-Phospho-DL-threonine	199.10	27530-80-9	2485125
26, 40, 49, 88	26	0.20% w/v	Acetylsalicylic acid	180.16	50-78-2	2000641	32, 68	32	0.20% w/v	Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate	829.51	84366-81-4	2827338
26, 39, 95	(C2)	0.20% w/v	Choline base solution	121.18	123-41-1		32	(C8)	0.20% w/v	DL-Xylose	150.13	25990-60-7	2473958
26, 76		0.20% w/v	Nicotinamide	122.12	98-92-0	2027134	32, 71		0.20% w/v	Nalidixic acid	232.24	389-08-2	2068647
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
16, 27		0.20% w/v	Uridine 5'-diphosphate sodium salt	404.16	21931-53-3		18, 33, 90		0.20% w/v	Guanosine	283.24	118-00-3	2042278
27, 37		0.20% w/v	L-Carnosine	226.24	305-84-0	2061699	26, 33, 55, 94		0.20% w/v	D-Glucose 6-phosphate sodium salt	282.12	54010-71-8	2589210
27, 41, 93	27	0.20% w/v	L-Thyroxine	776.87	51-48-9	2001011	33, 40	33	0.20% w/v	2,3-Pyridinedicarboxylic acid	167.12	89-00-9	2018748
27, 31, 96	(C3)	0.20% w/v	Sodium phenyl phosphate dibasic dihydrate	254.09	66778-08-3	2219174	22, 33, 44, 54, 66, 85, 93	(C9)	0.20% w/v	L-Tyrosine	181.19	60-18-4	2004604
27, 76		0.20% w/v	Glutaric acid	132.12	110-94-1	2038172	33, 70		0.20% w/v	Adenosine 5'-diphosphate sodium salt	427.20	20398-34-9	
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
12, 28, 37, 38, 91		0.20% w/v	Cytosine	111.10	71-30-7	2007495	14, 34, 73		0.25% w/v	2'-Deoxyguanosine hydrate	267.24 (anhyd)	961-07-9	
28, 40		0.20% w/v	Vitamin B12	1355.37	68-19-9	2006800	30, 34	34	0.25% w/v	Cortisone	360.45	53-06-5	2001624
28, 31	28	0.20% w/v	Pepstatin A	685.91	26305-03-3	2476000	24, 34	(C10)	0.25% w/v	α-Ketoglutaric acid disodium salt	190.06	305-72-6	2061678
28, 35	(C4)	0.20% w/v	Shikimic acid	174.15	138-59-0	2053342	34, 69		0.25% w/v	Pyruvic acid	88.06	127-17-3	2048243
28, 76		0.20% w/v	N-Acetyl-L-glutamic acid	189.17	1188-37-0	2147084	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	19, 35, 90		0.20% w/v	Thymidine	242.23	50-89-5	2000704
29		0.20% w/v	2'-Deoxycytidine 5'-triphosphate disodium salt	511.12	102783-51-7		35, 38	35	0.20% w/v	trans-Dihydroandrosterone	288.43	53-43-0	2001755
29, 36	29	0.20% w/v	Hydrocortisone	362.47	50-23-7	2000201	22, 35	35	0.20% w/v	Xanthine	152.11	69-89-6	2007186
29, 37	(C5)	0.20% w/v	Hemin	651.94	16009-13-5	2401401	26, 35	(C11)	0.20% w/v	Shikimic acid	174.15	138-59-0	2053342
29, 32		0.20% w/v	O-Phospho-DL-threonine	199.10	27530-80-9	2485125	35, 68		0.20% w/v	Histamine dihydrochloride	184.07	56-92-8	2002984
29, 43, 54, 85		0.20% w/v	L-Phenylalanine	165.19	63-91-2	2005681	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	13, 36, 69		0.20% w/v	Uridine	244.20	58-96-8	2004075
30, 34		0.04% w/v	Cortisone	360.45	53-06-5	2001624	29, 36		0.20% w/v	Hydrocortisone	362.47	50-23-7	2000201
30, 31, 69		0.04% w/v	(±) Epinephrine	183.21	329-65-7	2063476	23, 36, 56, 93	36	0.20% w/v	N-Acetylneuraminic acid	309.27 (anhyd)	131-48-6	2050231
30, 50	30	0.04% w/v	Protoporphyrin disodium salt	606.62	50865-01-5	2568159	24, 36	(C12)	0.20% w/v	2-Nitrophenyl β-D-galactopyranoside	301.25	369-07-3	2067161
30, 37, 41	(C6)	0.04% w/v	Pyridoxine	169.18	65-23-6	2006030	36, 65		0.20% w/v	Phospho(enol)pyruvic acid monosodium salt hydrate	208.04	53823-68-0	2588107
30, 72		0.04% w/v	Thymidine 5'-monophosphate disodium salt hydrate	366.18 (anhyd)	33430-62-5	2515180	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697							

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

silver ♦ **bullets™ bio**

Wells D1 - D12

HAMPTON
RESEARCH

Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC	Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC
12, 28, 37, 38, 91		0.20% w/v	Cytosine	111.10	71-30-7	2007495	43, 54, 85		0.125% w/v	L-Methionine	149.21	63-68-3	2005829
30, 37, 41		0.20% w/v	Pyridoxine	169.18	66-23-6	2006030	28, 43, 54, 85		0.125% w/v	L-Phenylalanine	165.19	63-91-2	2005881
29, 37	37	0.20% w/v	Hemin	651.94	16009-13-5	2401401	43, 54, 85		0.125% w/v	L-Leucine	131.18	61-90-5	2005220
27, 37	(D1)	0.20% w/v	L-Carnitine	226.24	305-84-0	2061699	43, 54, 85	43	0.125% w/v	L-Isoleucine	131.18	73-32-5	2007982
37, 64		0.20% w/v	Cytidine 5'-diphosphocholine sodium salt dihydrate	546.34	33818-15-4		43, 54, 85	(D7)	0.125% w/v	L-Valine	117.15	72-18-4	2007736
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	43, 54, 72, 85		0.125% w/v	L-Alanine	89.09	56-41-7	2002738
12, 28, 37, 38, 91		0.20% w/v	Cytosine	111.10	71-30-7	2007495	43, 54, 85		0.125% w/v	L-Proline	204.23	73-22-3	2007956
23, 38, 95		0.20% w/v	α-D-Glucose 1-phosphate disodium salt hydrate	304.10 (anhyd)	56401-20-8	2601541	43, 54, 85		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	115.13	147-86-3	2057022
35, 38	38	0.20% w/v	trans-Dehydroandrostereone	288.43	53-43-0	2001755	Buffer		0.14% w/v	Glycine	75.07	56-40-6	2002722
25, 38	(D2)	0.20% w/v	Isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside	238.30	367-93-1	2067030	44, 54, 85		0.14% w/v	L-Asparagine monohydrate	150.13	5794-13-8	2007359
38, 63		0.20% w/v	D-(-)-Ribose	150.13	50-69-1	2000594	44, 54, 85		0.14% w/v	L-Glutamine	146.15	56-85-9	2002921
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	22, 33, 44, 54, 66, 85, 93	44	0.14% w/v	L-Tyrosine	181.19	60-18-4	2004604
39, 42		0.20% w/v	Thiamine pyrophosphate	460.77	154-87-0	2058361	44, 54, 85	(D8)	0.14% w/v	L-Serine	105.09	56-46-1	2002743
26, 39, 95	39	0.20% w/v	D-Gluconic acid	195.17	3646-66-2	2228791	44, 54, 85		0.14% w/v	L-(+)-Threonine	119.12	72-19-5	2007741
25, 39	(D3)	0.20% w/v	Choline base solution	121.18	123-41-1		44, 77, 84		0.14% w/v	Maleic acid	116.07	110-16-7	2037425
25, 39, 40		0.20% w/v	Theophylline	180.17	58-55-9	2003857	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer		0.20% w/v	Ethanolamine	61.08	141-43-5	2054833	45		0.14% w/v	Sodium bromide	102.89	7647-15-6	2315999
26, 40, 49, 88		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	45		0.14% w/v	Sodium fluoride	41.99	7681-49-4	2316678
28, 40		0.20% w/v	Acetylsalicylic acid	180.16	50-78-2	2000641	45	45	0.14% w/v	Sodium carbonate	105.99	497-18-8	2075388
33, 40	40	0.20% w/v	Vitamin B12	1355.37	68-19-9	2006800	45	(D9)	0.14% w/v	Sodium tetraborate decahydrate	381.37	1303-96-4	2155404
25, 39, 40	(D4)	0.20% w/v	2,3-Pyridinedicarboxylic acid	167.12	89-00-9	2018748	45		0.14% w/v	Sodium phosphate dibasic dihydrate	177.59	10228-24-7	2314487
		0.20% w/v	Ethanolamine	61.08	141-43-5	2054833	45		0.14% w/v	Sodium nitrate	84.99	7631-99-4	2315543
		0.20% w/v	Thiamine hydrochloride	337.27 (anhyd)	67-03-8	2006418	Buffer		0.14% w/v	Rhenium(V) oxide	218.21	12036-06-8	2346390
		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	46		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
22, 41		0.16% w/v	L-Lactic acid	90.08	79-33-4	2011982	46	46	0.002 M	Calcium chloride dihydrate	147.01	10035-04-8	2331408
41, 42, 54, 85		0.16% w/v	L-Aspartic acid	133.10	56-84-8	2002916	46	46	0.002 M	Cadmium chloride dihydrate	183.32	654054-66-7	
27, 41, 93	41	0.16% w/v	L-Threonine	776.87	51-48-9	2001011	46	(D10)	0.002 M	Magnesium chloride hexahydrate	203.30	7791-18-6	2320946
30, 37, 41	(D5)	0.16% w/v	Pyridoxine	169.18	65-23-6	2006030	46		0.002 M	Magnesium(l) chloride tetrahydrate	197.91	13446-34-9	2318996
41, 79		0.16% w/v	L-Ascorbic acid	176.12	50-81-7	2000662	Buffer		0.002 M	Zinc chloride	136.30	7646-85-7	2319320
41, 63		0.16% w/v	Phytic acid sodium salt hydrate	660.04 (anhyd)	14306-25-3 (anhyd)	2382426	47		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	47	47	0.002 M	Nickel(II) chloride hexahydrate	237.69	7791-20-0	2317430
39, 42		0.16% w/v	Thiamine pyrophosphate	460.77	154-87-0	2058361	47	(D11)	0.002 M	Copper(II) chloride dihydrate	170.48	10125-13-0	2312102
41, 42, 54, 85		0.16% w/v	L-Aspartic acid	133.10	56-84-8	2002916	47		0.002 M	Cobalt(II) chloride hexahydrate	237.93	7791-13-1	2315894
10, 42, 54, 85	42	0.16% w/v	L-Glutamic acid	147.13	56-86-0	2002937	Buffer		0.002 M	Molybdenum(III) chloride	202.29	13478-16-7	2367759
42, 54, 85	(D6)	0.16% w/v	L-(+)-Lysine	146.19	56-87-1	2002942	7, 48		0.16% w/v	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
1, 10, 21, 42, 54, 85		0.16% w/v	L-Arginine	174.20	74-79-3	2008111	2, 48	48	0.16% w/v	L-Homoserine	119.12	672-15-1	2115906
42, 54, 85		0.16% w/v	L-Histidine	155.16	71-00-1	2007453	48	48	0.16% w/v	4-Hydroxy-L-proline	131.13	51-35-4	2000919
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	3, 48	(D12)	0.16% w/v	Argininosuccinic acid disodium salt hydrate	304.24 (anhyd)	918149-29-8 (anhyd)	
							19, 48		0.16% w/v	Cytidine	243.22	65-46-3	2066109
							48, 53		0.16% w/v	Inosine	268.23	58-63-9	2003904
									0.16% w/v	Guanine	151.13	73-40-5	2007998
							Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

Wells E1 - E12

Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC
49, 82, 90		0.16% w/v	Thiamine monophosphate chloride anhydrate	416.82	273724-21-3	2085369
28, 40, 49, 88		0.16% w/v	Acetylsalicylic acid	180.16	50-78-2	2000641
4, 49	49	0.16% w/v	Cholic acid	408.58	81-25-4	2013378
49	(E1)	0.16% w/v	1,2,3-Heptanetriol	148.20	103404-57-5	
48, 53		0.16% w/v	Vanillin	152.15	121-33-5	2044652
49, 56		0.16% w/v	HEPES sodium pH 6.8	221.21	7772-94-3	
Buffer		0.02 M		260.29	75277-39-3	2781697
50		0.20% w/v	Adenosine 5'-(β-D-ribo)triphosphate tetralithium salt hydrate	529.93	72957-42-7	2771275
30, 50	50	0.20% w/v	Protoporphyrin disodium salt	606.62	50065-01-5	2568159
50, 53	(E2)	0.20% w/v	Coproporphyrin I dihydrochloride	727.64	69477-27-6	
50, 56		0.20% w/v	Tris	121.14	77-86-1	2010644
50, 55		0.20% w/v	DL-Glycerinaldehyde	90.08	56-82-6	2002900
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
39, 51		0.16% w/v	D-Gluconic acid	195.17	3646-68-2	2228791
6, 51		0.16% w/v	D-(+)-Galactosamine hydrochloride	215.63	1772-03-8	2171981
51	51	0.16% w/v	N-(+)-Glucosamine hydrochloride	215.63	66-84-2	2006381
8, 51	(E3)	0.16% w/v	Sodium gluconate	218.14	527-07-1	2084077
51, 53		0.16% w/v	D-Mannosamine hydrochloride	215.63	5505-63-5	2268478
51, 55		0.16% w/v	D-(+)-Mannose	180.16	3458-28-4	2223924
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
52, 81	52	0.16% w/v	D-Glucosamine 6-phosphate sodium salt	259.15	70442-23-8	
52, 82	52	1.00% w/v	Tryptone	342.30	499-40-1	
52, 55	(E4)	0.16% w/v	Isomaltose	342.30	499-40-1	
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
50, 53		0.04% w/v	Coproporphyrin I dihydrochloride	727.64	69477-27-6	
49, 53	53	0.04% w/v	Vanillin	152.15	121-33-5	2044652
51, 53	(E5)	0.04% w/v	D-Mannosamine hydrochloride	215.63	5505-63-5	2268478
53, 55		0.04% w/v	D-(+)-Fucose	164.16	3615-37-0	2227929
48, 53		0.04% w/v	Guanine	151.13	73-40-5	2007998
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC
23, 38, 59, 93		0.16% w/v	N-Acetylneuraminic acid	309.27 (anhyd)	131-48-6	2050231
293.27		0.16% w/v	N-Acetylmuramic acid	293.27	10597-89-4	2342142
221.21		0.16% w/v	N-Acetyl-D-mannosamine	221.21	7772-94-3	
221.21	56	0.16% w/v	N-Acetyl-D-glucosamine	221.21	7512-17-6	2313682
121.14	(E8)	0.16% w/v	Tris	121.14	77-86-1	2010644
150.13		0.16% w/v	L-(+)-Arabinose	150.13	5328-37-0	2282146
260.29		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
328.37		0.16% w/v	Tyr-Phe	328.37	17355-11-2	
244.34		0.16% w/v	Leu-Leu	244.34	3303-31-9	2219766
202.25	57	0.16% w/v	Ala-Leu	202.25	3303-34-2	2219771
204.23		0.16% w/v	Val-Ser	204.23	13588-94-8	
297.74	(E9)	0.16% w/v	Tyr-Gly hydrochloride	297.74	63193-13-5	
206.26		0.16% w/v	Met-Gly	206.26	14486-03-4	2384879
260.29		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
328.37		0.16% w/v	Tyr-Phe	328.37	17355-11-2	
294.35		0.16% w/v	Tyr-Leu	294.35	17355-10-1	
398.46	58	0.16% w/v	Z-Val-Phe	398.46	19542-51-9	
189.17	(E10)	0.16% w/v	Gly-Gly-Gly	189.17	556-33-2	2091220
297.74		0.16% w/v	Ala-Ala	160.17	1948-31-8	2177517
		0.16% w/v	Tyr-Gly hydrochloride	297.74	63193-13-5	
260.29		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
245.28		0.20% w/v	Leu-Gly-Gly	245.28	1187-50-4	2146981
244.34		0.20% w/v	Leu-Leu	244.34	3303-31-9	2219766
307.37	59	0.20% w/v	Met-Ala-Ser	307.37	17351-33-6	
231.25	(E11)	0.20% w/v	Ala-Ala-Ala	231.25	5874-90-8	2275380
189.17		0.20% w/v	Gly-Gly-Gly	189.17	556-33-2	2091220
297.74		0.20% w/v	Tyr-Gly hydrochloride	297.74	63193-13-5	
260.29		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
246.22		0.16% w/v	Gly-Gly-Gly-Gly	246.22	637-84-3	2113034
245.28		0.16% w/v	Leu-Gly-Gly	245.28	1187-50-4	2146981
307.37	60	0.16% w/v	Met-Ala-Ser	307.37	17351-33-6	
303.28	(E12)	0.16% w/v	Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	303.28	7093-67-6	2303983
202.25		0.16% w/v	Ala-Leu	202.25	3303-34-2	2219771
294.35		0.16% w/v	Tyr-Leu	294.35	17355-10-1	
260.29		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer						

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

silver ♦ bullets™ bio

Wells F1 - F12

**HAMPTON
RESEARCH**

Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC	Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC
61, 95	61	0.25% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt	833.35	2646-71-1	2201633	67, 81, 87	67	0.20% w/v	Thymine	126.11	65-71-4	2006161
61, 73, 87, 88		0.25% w/v	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	551.15	987-85-5		63, 67		0.20% w/v	Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate	446.06	13472-36-1	2317671
13, 61		0.25% w/v	N-Acetyl-D-glucosamine	221.21	1811-31-0	2173219	6, 67		0.20% w/v	D-Glyceric acid calcium salt dihydrate	143.12	14028-62-7	
61		0.25% w/v	Gentamicin sulfate salt hydrate		1405-41-0	2157789	67, 69		0.20% w/v	β-Cyclodextrin	1134.98	7585-39-9	2314332
Buffer	(F1)	0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	67	(F7)	0.20% w/v	mvp-histidil	180.16	87-89-8	2017812
52, 62		0.20% w/v	Tryptone				Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
15, 17, 62		0.20% w/v	Inosine 5'-monophosphate disodium salt	392.17	352195-40-5	2251464	68, 90		0.20% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate	663.43	53-84-9	2001844
62		0.20% w/v	D-Lactose monohydrate	360.31	64044-51-5	2005592	11, 68, 90		0.20% w/v	D-Fructose 1,6-diphosphate trisodium salt octahydrate	550.18	81028-91-3	2537780
1, 54, 62	(F2)	0.20% w/v	L-Citrulline	175.19	372-75-8	2067596	68, 94	(F6)	0.20% w/v	Spermidine	145.25	124-20-9	2048890
62, 73		0.20% w/v	2'-Deoxycytidine 5'-monophosphate sodium salt	351.16	13085-50-2	2359952	68		0.20% w/v	Adenosine 5'-diphosphoribose sodium salt	559.32	68414-18-6	
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	35, 68		0.20% w/v	Histamine dihydrochloride	184.07	56-92-8	2002964
63, 67		0.20% w/v	Sodium pyrophosphate tetrabasic decahydrate	446.06	13472-36-1	2317671	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
38, 63	63	0.20% w/v	D-(-)-Ribose	150.13	50-69-1	2000594	69, 87	(F9)	0.20% w/v	Pyridoxal 5-phosphate monohydrate	265.16	41468-25-1	
41, 63		0.20% w/v	Phytic acid sodium salt hydrate	660.04 (anhyd)	14306-25-3 (anhyd)	2382426	34, 69		0.20% w/v	Pyruvic acid	88.06	127-17-3	2048243
18, 19, 63		0.20% w/v	Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt monohydrate	369.20	37839-81-9	2533283	67, 69		0.20% w/v	β-Cyclodextrin	1134.98	7585-39-9	2314332
63		0.04% w/v	Acetyl coenzyme A sodium salt	809.58	102029-73-2		30, 31, 69		0.20% w/v	(±) Epinephrine	183.21	329-65-7	2063476
Buffer	(F3)	0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	69	(F10)	0.20% w/v	mvp-histidil 2-monophosphate bis(cyclohexylammonium) salt	458.49	103529-92-6	
64		0.25% w/v	S-(5'-Adenosyl)-L-methionine chloride	434.90	24346-00-7	2461848	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
3, 64		0.25% w/v	Disodium beta-Glycerophosphate tetrahydrate	216.04 (anhyd)	819-83-0	2124643	33, 70		0.20% w/v	Adenosine 5'-diphosphate sodium salt	427.20	20398-34-9	
15, 64		0.25% w/v	Stachyose hydrate	666.58	54261-98-2	2074273	70, 96		0.20% w/v	Uridine 5'-monophosphate disodium salt hydrate	368.15	3387-36-8	2222119
37, 64	(F4)	0.25% w/v	Cytidine 5'-diphosphocholine sodium salt dihydrate	546.34	33818-15-4		70	(F11)	0.20% w/v	Cytidine 5'-diphosphate sodium salt hydrate	403.18	34393-59-4	2519908
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	70, 92		0.20% w/v	Cytidine 5'-monophosphate disodium salt	367.16	6757-06-8	2298193
65, 90		0.20% w/v	Biotin	244.31	58-85-5	2003983	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
36, 65		0.20% w/v	Phospho(enol)pyruvic acid monosodium salt hydrate	208.04	53823-68-0	2588107	71, 76		0.20% w/v	Pyridoxal hydrochloride	203.63	65-22-5	2006025
65, 78	65	0.20% w/v	Sodium pyruvate	110.04	113-24-6	2040244	71	(F12)	0.20% w/v	2'-Deoxyadenosine 5'-monophosphate	331.23	653-63-4	2115031
18, 65		0.20% w/v	D-(+)-Maltotriose hydrate	504.44 (anhyd)	207511-10-2	209-894-9	71, 94		0.20% w/v	Guanosine 5'-diphosphate sodium salt	443.20	43139-22-6	
65		0.20% w/v	Coenzyme B12	1579.61	13870-90-1	2376276	32, 71		0.20% w/v	Nalidixic acid	232.24	389-08-2	2068647
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	71, 77		0.20% w/v	Uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt	651.32	91185-98-1	2938205
32, 66	66	0.20% w/v	Flavin adenine dinucleotide disodium salt hydrate	829.51	84366-81-4	2827338	Buffer	(F12)	0.25% w/v	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
66, 80		0.20% w/v	D-(-)-3-Phosphoglyceric acid disodium salt	230.02	80731-10-8		72, 89		0.25% w/v	Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate	523.18	36051-31-7	2528472
66, 87		0.20% w/v	Spermine	202.34	71-44-3	2007542	30, 72		0.25% w/v	Thymidine 5'-monophosphate disodium salt hydrate	366.18 (anhyd)	33430-62-5	2515180
66		0.20% w/v	Adenosine-5'-diphosphoglucose disodium salt	633.31	102129-65-7		43, 54, 72, 85		0.25% w/v	L-Tryptophan	204.23	73-22-3	2007956
22, 33, 44, 54, 66, 85, 93	(F6)	0.20% w/v	L-Tyrosine	181.19	60-18-4	2004604	31, 72		0.25% w/v	Inosine 5'-triphosphate trisodium salt	574.11	35908-31-7	
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

silver ♦ **bullets™ bio**

Wells G1 - G12

**HAMPTON
RESEARCH**

Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC	Also in	Well #	[units]	Silver Bullet Bio	MW	CAS	EC
61, 73, 87, 88		0.20% w/v	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	551.15	987-65-5		80, 95		0.16% w/v	Riboflavin	376.36	83-88-5	2015071
62, 73		0.20% w/v	2'-Deoxyxydine 5'-monophosphate sodium salt	351.16	13085-50-2	2359562	9, 80		0.16% w/v	L-α-Phosphatidylcholine		8002-43-5	2323072
73	73	0.20% w/v	β-Estradiol	272.38	50-28-2	2000238	14, 80	80	0.16% w/v	D-(+)-Raffinose pentahydrate	594.52	17629-30-0	2081469
73, 90	(G1)	0.20% w/v	D-(+)-Galactose	180.16	59-23-4	2004164	66, 80	(G8)	0.16% w/v	D-(+)-3-Phosphoglyceric acid disodium salt	230.02	80731-10-8	
14, 34, 73		0.20% w/v	2'-Deoxyguanosine hydrate	267.24 (anhyd)	961-07-9		75, 80, 84		0.16% w/v	γ-Aminobutyric acid	103.12	56-12-2	2002586
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	80		0.16% w/v	Thionicotinamide adenine dinucleotide	679.50	4090-29-3	2238286
74	74	10% v/v	Tacsimate pH 7.0				Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
Buffer	(G2)	0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	13, 25, 81, 91		0.16% w/v	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate sodium salt hydrate	347.22 (anhyd)		
75, 88		0.20% w/v	DL-α-Lipoic acid	206.33	1077-28-7	2140712	7, 81		0.16% w/v	Cholesterol	386.66	57-88-5	2003532
75, 87		0.20% w/v	Creatine monohydrate	149.15	6020-87-7	2003066	67, 81, 87	81	0.16% w/v	Thymine	126.11	65-71-4	2006161
75	75	0.20% w/v	L-Glutathione reduced	307.32	70-18-8	2007254	11, 81	(G9)	0.16% w/v	Oxamic acid	89.05	471-47-6	2074430
75, 79, 89	(G3)	0.20% w/v	D-Pantothenic acid hemicalcium salt	238.27	137-08-6	2052789	52, 81		0.16% w/v	D-Glucosamine 6-phosphate sodium salt	259.15	70442-23-8	
75, 80, 84		0.20% w/v	γ-Aminobutyric acid	103.12	56-12-2	2002566	81		0.16% w/v	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt	367.19	40732-48-7	2550560
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
71, 76		0.20% w/v	Pyridoxal hydrochloride	203.63	65-22-5	2006025	49, 82, 90		0.20% w/v	Thiamine monophosphate chloride dihydrate	416.82	273724-21-3	2085369
26, 76	76	0.20% w/v	Nicotinamide	122.12	98-92-0	2027134	82, 89	82	0.20% w/v	Creatine phosphate disodium salt tetrahydrate	327.14	71519-72-7	2130746
76	(G4)	0.20% w/v	Batyl alcohol	344.57	544-62-7	2088747	6, 82	(G10)	0.20% w/v	N,N'-Benzoyl-L-arginine ethyl ester hydrochloride	342.83	2645-08-1	2201570
27, 76		0.20% w/v	Glutaric acid	132.12	110-94-1	2038172	82		0.20% w/v	Tetracycline hydrochloride	480.90	64-75-5	2005938
28, 76		0.20% w/v	N-Acetyl-L-glutamic acid	189.17	1186-37-0	2147084	5, 82		0.20% w/v	Succinic acid disodium salt hexahydrate	270.14	6106-21-4	
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
77, 88		0.20% w/v	Riboflavin 5'-monophosphate sodium salt dihydrate	514.36	6184-17-4	2049886	83, 93		0.20% w/v	Uridine 5'-triphosphate trisodium salt hydrate	550.09	19817-92-6	2433475
44, 77, 84		0.20% w/v	Maleic acid	116.07	110-16-7	2037425	1, 83	83	0.20% w/v	Kanamycin monosulfate	582.56	25389-94-0	2469339
21, 77, 84	77	0.20% w/v	Pyridoxamine dihydrochloride	241.11	524-36-7	2083576	3, 83	(G11)	0.20% w/v	Maltotriose hydrate	504.44	207511-08-8	2141742
77, 84	(G5)	0.20% w/v	Acetylcholine chloride	181.66	60-31-1	2004688	83		0.20% w/v	Leupeptin hydrochloride	463.02	24125-16-4	
71, 77		0.20% w/v	Uridine 5'-diphospho-N-acetylglucosamine sodium salt	651.32	91183-98-1	2938205	4, 83		0.20% w/v	Sodium glyoxylate monohydrate	114.03	2706-75-4	2202988
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
23, 78		0.20% w/v	Fumaric acid	116.07	110-17-8	2037430	84		0.16% w/v	5-Phospho-D-ribose 1-diphosphate pentasodium salt	499.98	108321-05-7	
24, 78	78	0.20% w/v	cis-Aconitic acid	174.11	585-84-2	2095644	44, 77, 84		0.16% w/v	Maleic acid	116.07	110-16-7	2037425
78	(G6)	0.20% w/v	DL-Isocitric acid trisodium salt	258.07	1637-73-6	2166683	56, 84, 89	84	0.16% w/v	N-Acetyl-D-glucosamine	221.21	7512-17-6	2313682
25, 78		0.20% w/v	Oxalacetic acid	132.07	328-42-7	2063298	84, 87	(G12)	0.16% w/v	L-(-)-Malic acid sodium salt	156.07	68303-40-2	
65, 78		0.20% w/v	Sodium pyruvate	110.04	113-24-6	2040244	75, 80, 84		0.16% w/v	γ-Aminobutyric acid	103.12	56-12-2	2002586
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	77, 84		0.16% w/v	Acetylcholine chloride	181.66	60-31-1	2004688
79, 89		0.04% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate	766.40	1184-16-3	2146646	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
10, 79		0.04% w/v	Tetrahydrofolic acid	445.43	135-16-0	2051811							
41, 79	79	0.04% w/v	L-Ascorbic acid	176.12	50-81-7	2000662							
20, 79	(G7)	0.04% w/v	D-(+)-Glucose	180.16	50-99-7	2000751							
		0.04% w/v	Folic acid	441.40 (anhyd)	59-30-3	3004190							
75, 79, 89		0.04% w/v	D-Pantothenic acid hemicalcium salt	238.27	137-08-6	2052789							
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697							

ANEXO B - Composição das soluções do kit Silver Bullets™ bio HR2-088 da Hampton Research

silver ♦ bullets™ bio

Wells H1 - H12

**HAMPTON
RESEARCH**

Also in	Well #	[units]	Silver Bullet	MW	CAS	EC	Also in	Well #	[units]	Silver Bullet	MW	CAS	EC	Also in	Well #	[units]	Silver Bullet	MW	CAS	EC
44, 54, 85		0.05% w/v	Glycine	75.07	56-40-6	2002722	82, 89		0.16% w/v	Creatine phosphate disodium salt tetrahydrate	327.14	71519-72-7	2130746	83, 93		0.20% w/v	Uridine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	550.09	19817-92-6	2433475
44, 54, 85		0.05% w/v	L-(+)-Threonine	119.12	72-19-5	2007741										0.20% w/v	Adenosine 5'-monophosphate sodium salt	347.22	149022-20-8	
42, 54, 85		0.05% w/v	L-(+)-Lysine	146.19	56-87-1	2002942	79, 89		0.16% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt hydrate	766.40	1184-16-3	2146646	70, 93		0.20% w/v	N-Acetylneuraminic acid	309.27 (anhyd)	131-48-6	2055231
1, 10, 21, 42, 54, 85		0.05% w/v	L-Alanine	89.09	56-41-7	2002738										0.20% w/v	L-Tyrosine	181.19	60-18-4	2004604
44, 54, 85		0.05% w/v	L-Arginine	174.20	74-79-3	2008111	72, 89		0.16% w/v	Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate	523.18	36051-31-7	2528472	22, 33, 44, 54, 66, 85, 93		0.20% w/v	L-Threonine	776.87	51-48-9	2001011
41, 42, 54, 85		0.05% w/v	L-Asparagine monohydrate	150.13	5794-13-8	2007559	13, 36, 89		0.16% w/v	D-Pantothenic acid hemicalcium salt	244.20	58-96-8	2004075	27, 41, 93		0.20% w/v	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
10, 42, 54, 85		0.05% w/v	L-Glutamic acid	147.13	56-86-0	2002837	75, 79, 89		0.16% w/v	N-Acetyl-D-glucosamine	238.27	137-08-6	2052789	Buffer		0.16% w/v	Pyridoxamine dithydrochloride	241.11	524-36-7	2083576
44, 54, 85		0.05% w/v	L-Glutamine	146.15	56-85-9	2002921	56, 84, 89		0.16% w/v	Thiamine monophosphate chloride dihydrate	221.21	7512-17-6	2713682	21, 77, 94		0.16% w/v	Guanosine 5'-diphosphate sodium salt	443.20	43139-22-6	
42, 54, 85		0.05% w/v	L-Histidine	155.16	71-00-1	2007453	Buffer		0.14% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide hydrate	260.29	73724-21-3	2083569	71, 94		0.16% w/v	Cytidine 5'-triphosphate disodium salt	527.12	36051-68-0	2528493
43, 54, 85		0.05% w/v	L-Isoleucine	131.18	73-32-5	2007982	49, 82, 90		0.14% w/v	Thymidine	285.24	118-00-3	2042278	15, 94		0.16% w/v	D-Glucose 6-phosphate sodium salt	282.12	54010-71-8	2589210
43, 54, 85		0.05% w/v	L-Leucine	131.18	61-90-5	2005220			0.14% w/v	D-(+)-Galactose	180.16	59-23-4	2004164	3, 17, 94		0.16% w/v	O-Phospho-L-tyrosine	261.17	21820-51-9	
43, 54, 85		0.05% w/v	L-Methionine	149.21	60-66-3	2005629	66, 90		0.14% w/v	Biotin	244.31	59-85-5	2003993	68, 94		0.16% w/v	Spermidine	145.25	124-20-9	2046990
29, 43, 54, 85		0.05% w/v	L-Phenylalanine	165.19	63-91-2	2005681	18, 33, 90		0.14% w/v	D-Fructose 1,6-diphosphate disodium salt octahydrate	550.18	81028-91-3	2537780	Buffer		0.02 M	L-Carnitine hydrochloride	197.66	6645-46-1	2296636
43, 54, 85		0.05% w/v	L-Proline	115.13	147-85-3	2002743	18, 33, 90		0.16% w/v	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	2, 12, 95		0.16% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate tetrasodium salt	833.35	2646-71-1	2201633
44, 54, 85		0.05% w/v	L-Serine	105.09	56-45-1	2002743	19, 35, 90		0.16% w/v	Thymidine 5'-triphosphate sodium salt	347.22 (anhyd)			61, 95		0.16% w/v	2'-Deoxyadenosine 5'-triphosphate disodium salt	535.15	1927-31-7	2176623
43, 54, 72, 85		0.05% w/v	L-Threonine	204.23	73-22-3	2007956	73, 90		0.16% w/v	4-Aminobenzic acid	137.14	150-13-0	2057530	12, 26, 95		0.16% w/v	Choline base solution	121.18	123-41-1	
22, 33, 44, 54, 66, 85, 93		0.05% w/v	L-Tyrosine	181.19	60-18-4	2004004	65, 90		0.16% w/v	Cytosine	111.10	71-30-7	2007495	23, 38, 95		0.16% w/v	α-D-Glucose 1-phosphate disodium salt hydrate	304.10 (anhyd)	56401-20-8	2601541
43, 54, 85		0.05% w/v	L-Valine	117.15	72-18-4	2007796	11, 66, 90		0.16% w/v	Benzamidine hydrochloride	156.61	1670-14-0	2167954	80, 95		0.16% w/v	Riboflavin	376.36	83-89-5	2015071
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
60, 86		0.14% w/v	Gly-Gly-Gly-Gly-Gly	303.26	7093-67-6	2303983	13, 25, 31, 91		0.16% w/v	2'-Deoxyguanosine 5'-monophosphate sodium salt hydrate	347.22 (anhyd)					0.16% w/v	Uridine 5'-monophosphate disodium salt hydrate	368.15	3387-36-8	2222119
59, 60, 86		0.14% w/v	Leu-Gly-Gly	245.28	1187-50-4	2146981			0.16% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt	741.63	104805-32-7				0.16% w/v	D-(+)-Malic acid monohydrate	360.32	6963-53-7	2007165
59, 60, 86		0.14% w/v	Ala-Ala-Ala	231.25	5974-90-8	2275390	14, 24, 91		0.16% w/v	Cytosine	111.10	71-30-7	2007495	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
57, 60, 86		0.14% w/v	Met-Ala-Ser	307.37	17351-35-6		13, 19, 91		0.16% w/v	4-Aminobenzic acid	137.14	150-13-0	2057530	9, 14, 96		0.16% w/v	O-Phospho-L-serine	185.07	407-41-0	2068960
58, 86		0.14% w/v	Val-Ser	204.23	13588-94-8		12, 28, 37, 38, 91		0.16% w/v	Thymidine 5'-triphosphate sodium salt	347.22 (anhyd)			4, 13, 96		0.16% w/v	Benzidine	184.24	92-87-5	2021991
61, 73, 87, 88		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	7, 11, 91		0.16% w/v	Benzamidine hydrochloride	156.61	1670-14-0	2167954	12, 96		0.16% w/v	Sodium phenyl phosphate dibasic anhydride	254.09	66778-06-3	2219174
69, 87		0.16% w/v	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	551.15	967-65-5		91, 92		0.16% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt	741.63	104805-32-7		27, 31, 96		0.16% w/v	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
75, 87		0.16% w/v	Pyridoxal 5-phosphate monohydrate	265.16	41468-25-1		Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697
67, 81, 87		0.16% w/v	Creatine monohydrate	149.15	6020-87-7	2003066			0.16% w/v	Guanosine 5'-triphosphate disodium salt	523.18	36051-31-7	2528472	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
84, 87		0.16% w/v	Thymine	126.11	65-71-4	2006161	91, 92		0.16% w/v	Cytosine	111.10	71-30-7	2007495	8, 96		0.16% w/v	O-Phospho-L-serine	185.07	407-41-0	2068960
66, 87		0.16% w/v	L-(+)-Malic acid sodium salt	156.07	68303-40-2		92		0.16% w/v	β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced dipotassium salt	741.63	104805-32-7		8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
61, 73, 87, 88		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	92		0.16% w/v	Aspartame	294.30	23839-47-0	2425613	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
77, 88		0.16% w/v	Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	551.15	967-65-5		91, 92		0.16% w/v	Caffeine	194.19	58-08-2	2003621	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
26, 40, 49, 88		0.16% w/v	Riboflavin 5'-monophosphate sodium salt hydrate	514.96	6184-17-4	2049866	70, 92		0.16% w/v	Cytidine 5'-monophosphate disodium salt	367.16	6757-06-9	2298193	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
1, 88		0.16% w/v	DL-α-Lipoic acid	206.33	1077-28-7	2140712	70, 92		0.16% w/v	Cytidine 5'-monophosphate disodium salt	367.16	6757-06-9	2298193	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
22, 31, 88		0.16% w/v	Acetylsalicylic acid	180.16	50-76-2	2006441	70, 92		0.16% w/v	Cytidine 5'-monophosphate disodium salt	367.16	6757-06-9	2298193	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615
Buffer		0.02 M	HEPES sodium pH 6.8	260.29	75277-39-3	2781697	70, 92		0.16% w/v	Cytidine 5'-monophosphate disodium salt	367.16	6757-06-9	2298193	8, 96		0.16% w/v	D-Sorbitol	182.17	50-70-4	2008615

Hampton Research
 34 Journey
 Aliso Viejo, CA 92656-3317 USA
 Tel: (949) 425-1321 • Fax: (949) 425-1611
 Technical Support e-mail: tech@hamr.com
 Website: www.hamptonresearch.com