



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

Priscila Graziela Alves Martins

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA ARSENATO REDUTASE DE
Trypanosoma cruzi E INIBIÇÃO DE UMA FOSFOTIROSINA
FOSFATASE DE *Yersinia enterocolitica* POR CHALCONAS
SINTÉTICAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Dr. Hernán Terenzi

Co-orientador: Dr. Javier Vernal

Florianópolis

2011

Priscila Graziela Alves Martins

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA ARSENATO REDUTASE DE
Trypanosoma cruzi E INIBIÇÃO DE UMA FOSFOTIROSINA
FOSFATASE DE *Yersinia enterocolitica* POR CHALCONAS
SINTÉTICAS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

Florianópolis, 11 de fevereiro de 2011

Prof., Dr. Marcelo Farina
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Hernán Terenzi
Orientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Dr. Javier Vernal
Co-Orientador
Universidade Federal de Santa
Catarina

Dr. Guilherme Razzera
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof., Dr. Carlos Peres Silva
Universidade Federal de Santa
Catarina

Prof., Dr. Ronaldo da Silva
Mohana Borges
Instituto de Biofísica Carlos
Chagas Filho (UFRJ)

À minha família, meu namorado, meus amigos e
àqueles que me apoiaram e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Hernán Terenzi, por acreditar no meu trabalho, pela oportunidade, por dar apoio e pela orientação.

Ao meu co-orientador, Javier Vernal, por ajudar em todos os momentos de dúvidas, pelos conselhos e pela amizade.

Aos amigos do laboratório: Angélica, Camila, Carolina, Gabriela, Gabrielle, Giselle, Guilherme, Jean, João, Manuel, Patrícia Cardoso, Patrícia Rabello, Tiago e Ricardo pelo companheirismo, apoio e pelos momentos divertidos.

À Angela, grande companheira de experimentos, de cálculos, de purificações e de infindáveis horas gastas nas cinéticas dos inibidores da YopH. Muito obrigada por tudo, sem a sua ajuda não seria possível ter conseguido trabalhar com duas proteínas ao mesmo tempo durante o mestrado.

Aos alunos Kely, Alessandra, Marlon, Taisa do laboratório de estrutura e atividade (LEAT) do departamento de química da UFSC pela síntese dos compostos para triagem na YopH.

À Louise pela amizade, por me ajudar nas dúvidas sobre os inibidores e cálculos e pela síntese dos inibidores.

Ao professor Lucas Bleicher da UFMG por ter feito a análise estrutural da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*.

Aos órgãos de apoio financeiro CAPES, MCT, FAPESC, FINEP e CNPq.

Ao meu namorado Gilberto pela paciência, companheirismo e carinho. Por estar sempre presente, me incentivando e apoiando nos momentos difíceis. Por tornar minha vida mais alegre.

Às amigas de infância Flávia, Daiene e Simone por estarem sempre presentes. Às amigas de faculdade Cíntia, Bruna, Kelly e Amanda por me apoiarem.

A todas as outras pessoas que me ajudaram, me apoiaram e torceram por mim durante os últimos dois anos.

Gostaria também de dizer que fui agraciada com uma família maravilhosa a qual me incentivou e ajudou desde o começo a vencer os desafios para alcançar o sucesso. Aos meus pais, Arlindo e Rosa de Fátima expresso aqui meu amor, admiração e gratidão pelo apoio incondicional. Aos meus irmãos Marcelo e Viviani gostaria de dizer que o incentivo por eles prestado foi fundamental para realizar mais esta conquista.

“Que toda a lógica se cale quando a experiência a contradiz”

William Harvey

RESUMO

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas. Esta doença afeta de 15 a 16 milhões de pessoas na América Latina e, mesmo após um centenário de sua descoberta, ainda não se conseguiu desenvolver uma vacina e nem tratamentos totalmente eficazes. O presente trabalho apresenta a caracterização de uma arsenato redutase de *T. cruzi*. Esta enzima, apesar de ter significativa homologia com fosfatases de dupla-especificidade, apresenta uma baixa capacidade de defosforilar o substrato p-nitrofenilfosfato. Quando testada em um sistema de oxi-redução, a PTP putativa de *T. cruzi* é capaz de reduzir o arsenato [As(V)] à arsenito [As(III)] e esta redução requer a presença da enzima glutaredoxina. Este é o primeiro trabalho que descreve uma arsenato redutase de *T. cruzi*.

A fosfotirosina fosfatase YopH é um fator de virulência relevante na patogenicidade das bactérias *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*. A YopH tem a capacidade de modular a resposta inflamatória à bactéria através de processos que envolvem a quebra de adesões focais, liberação de fator de necrose α , inibição da fagocitose, além de também impedir a função dos linfócitos B e T prevenindo a resposta imune adaptativa. Devido à sua importância, a YopH emerge como um potencial alvo terapêutico. Neste trabalho foram analisados 265 compostos sintéticos, dos quais 4 apresentaram valores de IC₅₀ inferiores a 50 μ M, sendo eles L46 (38,55 μ M), P4 (15,08 μ M), P11(9,92 μ M) e R28 (20,29 μ M). Estes compostos são chalconas e atuam como inibidores competitivos da YopH com K_i de 11,01 μ M (L46), 3,13 μ M (P4), 2,41 μ M (P11) e 14,93 μ M (R28).

Palavras-chave: Fosfotirosina fosfatase, arsenato redutase, YopH, *Trypanosoma cruzi*, *Yersinia enterocolitica*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas' disease. This illness affects 15 to 16 million people in Latin America and even after a century of its discovery, it has not managed to develop a vaccine and effective treatment. This work presents the characterization of an arsenate reductase from *T. cruzi*. This enzyme, despite having a significant homology with dual specificity phosphatases, has a low capacity to dephosphorylate the substrate p-nitrophenyl phosphate. When tested in an oxi-reduction system, the putative PTP from *T. cruzi* is able to reduce arsenate to arsenite and this reduction requires the presence of glutaredoxin. This is the first study that describes an arsenate reductase from *T. cruzi*.

The phosphotyrosine phosphatase YopH is a relevant virulence factor in the pathogenicity of the bacteria *Yersinia pestis*; *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*. YopH is able to modulate the inflammatory response to the bacteria through processes that involves the disruption of focal adhesion, release of tumor necrosis factor α , inhibition of phagocytosis and also block the function of T and B lymphocyte preventing the adaptive immune response. Due to its importance, YopH emerges as a potential therapeutic target. In this work, it was analysed 265 synthetic compounds, among these 4 presented IC_{50} values below 50 μ M which are L46 (38.55 μ M), P4 (15.08 μ M), P11 (9.92 μ M) and R28 (20.29 μ M). These four compounds are chalcones and act as competitive inhibitors. They present the following K_i values: 11.01 μ M (L46), 3.13 μ M (P4), 2.41 μ M (P11) and 14.93 μ M (R28).

Keywords: phosphotyrosine phosphatase; arsenate reductase; YopH; *Trypanosoma cruzi*; *Yersinia enterocolitica*;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As diferentes formas morfológicas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 2. Ciclo celular do protozoário <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 3. Vias de transmissão das espécies de <i>Yersinia</i> patogênicas para humanos	31
Figura 4. Mecanismo catalítico da PTP1B	34
Figura 5. Possível mecanismo catalítico para SynArsC de <i>Synechocystis</i> sp. cepa PCC6803	37
Figura 6. Mecanismo catalítico proposto para arsenato redutases de bactérias Gram-positivas	38
Figura 7. Estrutura primária da fosfotirosina fosfatase putativa de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 8. Perfil cromatográfico da PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 9. SDS-Page com as frações da purificação da PTP de <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 10. Perfil cromatográfico da purificação da protease TEV	55
Figura 11. SDS-Page correspondente à purificação da protease TEV	55
Figura 12. Perfil cromatográfico da purificação da glutaredoxina 1 de <i>E. coli</i>	56
Figura 13. SDS-Page da purificação da glutaredoxina 1 de <i>E. coli</i>	56
Figura 14. Estrutura primária da Yop51* Δ 162	57
Figura 15. Perfil cromatográfico da YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i>	57
Figura 16. SDS-Page da purificação da fosfotirosina fosfatase YopH da <i>Yersinia enterocolitica</i>	58
Figura 17. SDS-PAGE da separação da PTP de <i>Trypanosoma cruzi</i> da cauda de histidinas e da protease TEV	58
Figura 18. Alinhamento das sequências primárias das proteínas PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i> e PRL-3 humana	59
Figura 19. Disposição dos elementos cisteína 114 (C114), Arginina 120 (R120), ácido aspártico 75 (D75) e glutamina 156 (Q156) no modelo estrutural da PTP de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 20. Gráfico da atividade de fosfatase da PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
Figura 21. Gráfico da atividade de arsenato redutase da PTP putativa de <i>T. cruzi</i>	63

Figura 22. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona L46	67
Figura 23. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona P4	68
Figura 24. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona P11	68
Figura 25. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona R28	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos que apresentaram porcentagem de inibição da atividade enzimática da YopH superior a 30%	64
Tabela 2. Compostos que apresentaram valores de IC ₅₀ inferiores a 50 μM	65
Tabela 3. Influência da incubação com a enzima nos valores de IC ₅₀ dos compostos P4, P11, L46 e R28	65
Tabela 4. Valores de IC ₅₀ com desvio padrão obtidos para os inibidores P4, P11, L46 e R28. Experimento com incubação inicial de cada composto com a YopH por 10 minutos	66
Tabela 5. Parâmetros cinéticos experimentais da YopH para o substrato pNPP e as chalconas L46, P4, P11 e R28	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GSH	glutathiona reduzida
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonila
pNPP	p-nitrofenilfosfato
pNP	p-nitrofenol
PTK	<i>protein tyrosine kinase</i>
PTP	<i>protein tyrosine phosphatase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel</i>
<i>Electrophoresis</i>	
TEV	<i>Tobacco etch vírus</i>
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Yop	<i>Yersinia outer membrane proteins</i>

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	25
1.1 Doença de Chagas	25
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.3 <i>Yersinia</i> spp	29
1.4 Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs)	31
1.5 Inibidores de fosfotirosina fosfatases	33
1.6 Arsenato redutases	35
2.0 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos específicos	39
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 Transformação das bactérias <i>Escherichia coli</i>	41
3.1.1 Preparação de células competentes para transformação	41
3.1.2 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS com os vetores pDEST17-PTP e pTH24-TEVSH	41
3.1.3 Transformação de bactérias <i>E. coli</i> BL21(DE3) com os vetores p7-7Yop51* Δ 162 e PET101/D-TOPO-GRX1	42
3.2 Expressão das proteínas recombinantes	42
3.2.1 Expressão da fosfotirosina fosfatase putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	42
3.2.2 Expressão da protease TEV	43
3.2.3 Expressão da proteína glutaredoxina 1 de <i>E. coli</i>	43
3.2.4 Expressão da proteína YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i>	43
3.3 Purificação das proteínas recombinantes	44

3.3.1 Purificação da fosfotirosina fosfatase putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
3.3.2 Purificação da protease TEV	45
3.3.3 Purificação da glutaredoxina 1 de <i>E. coli</i>	45
3.3.4 Purificação da YopH da <i>Yersinia enterocolitica</i>	45
3.4 Clivagem da fosfotirosina fosfatase putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i> com a protease TEV	46
3.5 Separação da fosfotirosina fosfatase putativa da protease TEV e da cauda de histidina	46
3.6 Modelagem computacional da estrutura da PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
3.7 Teste de atividade de fosfatase da PTP putativa de <i>T. cruzi</i>	48
3.8 Teste de atividade de arsenato redutase	48
3.9 Triagem de inibidores para a fosfotirosina fosfatase (YopH) de <i>Yersinia enterocolitica</i>	49
3.10 Cálculo de IC ₅₀	50
3.11 Cinética enzimática	51
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 Obtenção das proteínas recombinantes	53
4.1.1 Obtenção da PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
4.1.2 Obtenção da protease TEV	55
4.1.3 Obtenção da glutaredoxina 1 de <i>E. coli</i>	56
4.1.4 Obtenção da fosfotirosina fosfatase (YopH) de <i>Yersinia enterocolitica</i>	57
4.2 Separação da fosfotirosina fosfatase putativa da protease TEV e da cauda de histidina	58

4.3 Modelagem computacional da estrutura da PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
4.4 Teste de atividade de fosfatase com a enzima PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
4.5 Teste de atividade de arsenato redutase com a enzima PTP putativa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
4.6 Triagem de inibidores da fosfotirosina fosfatase YopH de <i>Yersinia enterocolitica</i>	64
4.7 Cálculos de IC ₅₀	64
4.8 Cinética enzimática	67
5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
6.0 PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE A – Compostos sintéticos testados na YopH	85

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma enfermidade debilitante causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Esta doença foi descrita pela primeira vez pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas em abril de 1909 (KROPF, 2010).

O principal meio de transmissão do protozoário é através das fezes contaminadas de insetos triatomíneos hematófagos pertencentes aos gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* (MARCILLA et al., 2002). Estes insetos são conhecidos popularmente como “barbeiros” ou “chupões” (GALVÃO, 2010). Além das fezes contaminadas destes triatomíneos, a transmissão também pode ocorrer por: transfusão sanguínea, via congênita, aleitamento materno, transplante de órgãos, via oral (alimentos *in natura*), acidentes de laboratório e também pelo manejo de animais contaminados (COURA, 2007). A doença de Chagas apresenta três fases: aguda, crônica sintomática e crônica latente.

A fase aguda da doença é caracterizada pela presença do parasita no sangue do paciente infectado. Em um esfregaço sanguíneo é possível visualizar a presença de tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Cerca de 95% dos casos de tripanossomíase americana na fase aguda são assintomáticos (TEIXEIRA et al., 2006). Nos casos sintomáticos pode-se visualizar o chagoma de inoculação, ou sinal de Romana, ou seja, o local de porta de entrada do parasita (COURA, 2007). Neste local há um inchaço que histologicamente mostra a presença de intensa reação inflamatória (HIGUCHI, 2010). Além do chagoma de inoculação a pessoa infectada pode apresentar outros sintomas como: febre, dores musculares, sonolência, diarreia e distúrbios respiratórios (TEIXEIRA et al., 2006). O paciente poderá morrer devido a complicações diretas da infecção pelo parasita, complicações secundárias como bronco-pneumonia, pela miocardite ou meningoencefalite (HIGUCHI, 2010).

Após a fase aguda, parte dos pacientes infectados passa a ter sintomas cardíacos ou digestivos, constituindo a fase crônica sintomática. No entanto a maioria dos pacientes, após a fase aguda, não desenvolve sinais ou sintomas atribuíveis à fase crônica da doença. Estes pacientes apresentam então, a fase crônica indeterminada ou

latente, na qual se estabelece um equilíbrio parasita-hospedeiro (HIGUCHI, 2010).

A fase crônica sintomática pode ser subdividida em forma crônica cardíaca e forma crônica digestiva. A forma crônica cardíaca é caracterizada por disfunções cardíacas como arritmia, insuficiência, tromboembolismo e hipertrofia (COURA, 2007). A forma crônica digestiva é marcada pela destruição dos plexos mesentéricos. Este fato acarreta falta de peristaltismo no esôfago e cólon, o que leva à retenção de alimentos causando a dilatação progressiva destes órgãos (megaesôfago e megacólon) (REZENDE, 2010).

O tratamento da doença de Chagas é longo (60 dias) e consiste na utilização do fármaco benznidazol ou nifurtimox. Estes medicamentos são utilizados há mais de quarenta anos, ou seja, não houve inclusão de novas terapias no tratamento. O benznidazol e o nifurtimox são mais efetivos na fase aguda onde podem curar até 80% dos infectados entretanto, são pouco efetivos na fase crônica. Os efeitos colaterais podem ser severos e não há formulações pediátricas. Até o presente momento, não há vacina para a doença de Chagas (MARCILLA et al., 2002; CLAYTON, 2010).

A doença de Chagas afeta entre 15 e 16 milhões de pessoas na América Latina, sendo que há cerca de 3 milhões de portadores da doença crônica no Brasil (COURA, 2007; BRASIL, 2010). Foram registrados só no Brasil, no período de 2000 a 2010, 1007 pacientes na fase aguda da doença. A maior parte destes casos (73%) foi devido à transmissão oral (BRASIL, 2010).

Em 2006 o Brasil recebeu o certificado internacional da interrupção da transmissão vetorial da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, concedida pela Organização Pan-Americana da Saúde (BRASIL, 2006). Esta certificação representa somente a interrupção da transmissão pela espécie *T. infestans*, o que não abrange os outros gêneros e as demais formas de transmissão.

A doença de Chagas é uma doença negligenciada. Por afetar principalmente países considerados pobres, as indústrias farmacêuticas não apresentam interesse na produção de medicamentos específicos para seu tratamento (CLAYTON, 2010). Por afetar uma grande quantidade de pessoas, medidas devem ser tomadas para a melhoria do diagnóstico, do controle do vetor e do desenvolvimento de fármacos e vacinas (TARLETON et al., 2007).

Um trabalho recente de Gabriel Schmunis e Zaida Yadon mostra que a doença de Chagas pode estar sendo levada através da imigração de pessoas infectadas (originárias de áreas endêmicas da América Latina)

para diversos países, como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e países da Europa. Como o próprio nome do trabalho destes autores sugere: “Doença de Chagas: Um problema de saúde da América Latina se tornando um problema de saúde mundial” (SCHMUNIS; YADON, 2010).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (SOUZA, 2010). Este parasita é um protozoário flagelado com um ciclo de vida complexo o qual permite sua adaptação em ambos os hospedeiros (insetos triatomíneos e mamíferos, incluso o homem) (ORR et al., 2000). O ciclo celular do *Trypanosoma cruzi* é um processo regulado e abrange significativas mudanças morfológicas, bioquímicas, de sinalização, expressão gênica e alterações estruturais de moléculas de superfície do parasita (DE SOUZA, 2002). Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* pode assumir três formas morfológicas distintas: amastigota, tripomastigota e epimastigota ilustradas na Figura 1 (DE SOUZA, 2002).

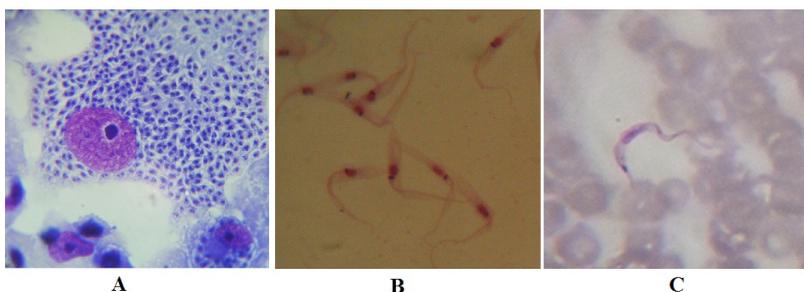


Figura 1: As diferentes formas morfológicas do *Trypanosoma cruzi*. (A) Amastigotas em macrófagos. (B) Epimastigotas. (C) Tripomastigota metacíclica. Fonte: fotos tiradas por Priscila G. A. Martins durante as aulas de parasitologia do curso de graduação em Farmácia da UFSC.

No ciclo celular do *Trypanosoma cruzi* as formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes de triatomíneos entram através de uma ferida ou de uma mucosa. Estas formas podem invadir diferentes tipos de células como as do músculo liso e estriado, fibroblastos e macrófagos. Nestas células as tripomastigotas ficam contidas em um vacúolo fagolisossomal do qual elas escapam e, no citosol diferenciam-se em amastigotas, as quais replicam por divisão binária. Após alguns ciclos de divisão as amastigotas diferenciam-se novamente em

tripomastigotas, as quais são liberadas na corrente sanguínea pela ruptura da célula do hospedeiro. Durante seu repasto, o triatomíneo ingere estas tripomastigotas do hospedeiro infectado, que se transformam em epimastigotas no seu estômago. Estas se multiplicam rapidamente por divisão binária quando atingem o intestino do inseto. No reto do triatomíneo algumas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas com as fezes durante o repasto do inseto, reiniciando assim o ciclo (DE SOUZA, 2002; ANDRADE; ANDREWS, 2005). A Figura 2 mostra as mudanças morfológicas que o parasita assume nos hospedeiros, vertebrado e invertebrado, e como ocorre o ciclo de infecção.

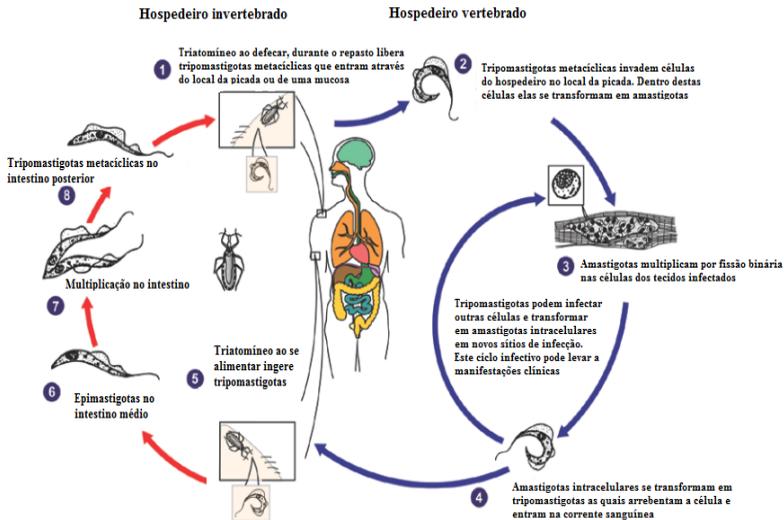


Figura 2: Ciclo celular do protozoário *Trypanosoma cruzi*. (1) transmissão para humanos de tripomastigotas metacíclicas através das fezes contaminadas do inseto barbeiro; (2) as tripomastigotas invadem as células humanas no local da picada, nestas células as tripomastigotas transformam-se em amastigotas; (3) as amastigotas se multiplicam por fissão binária no interior das células; (4) as amastigotas transformam-se novamente em tripomastigotas metacíclicas que arrebentam a célula e caem na corrente sanguínea onde podem infectar novas células, além disso podem ser ingeridas por triatomíneos durante seu repasto; (6) as tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto; (7) no intestino as epimastigotas multiplicam-se; (8) no intestino posterior do inseto as epimastigotas transformam-se em tripomastigotas onde podem ser eliminadas pelas fezes do inseto reiniciando o ciclo. Adaptado de (CLAYTON, 2010).

Em 2005 foi publicado na revista Science o genoma completo do *Trypanosoma cruzi* (EL-SAYED et al., 2005). Um projeto de transcriptoma (FIGUEIREDO DA SILVA et al., 2007), concebido após o sequenciamento, levou a identificação de genes de função desconhecida que eram mais expressos na forma infectiva do que na forma replicativa do parasita. Entre estes genes foi identificado um codificante de uma fosfotirosina fosfatase putativa a qual é caracterizada neste trabalho.

1.3 *Yersinia* spp.

O gênero *Yersinia* é formado por cocobacilos gram-negativos (BOTONE, 1999) e compreende dez espécies, sendo três destas patogênicas para o homem: *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* (TRABULSI; MARTINEZ, 2005).

A *Y. pestis* é o agente etiológico da peste. Esta doença é primariamente de roedores e espalha-se entre eles por contato direto ou por pulgas infectadas. A *Yersinia pestis* se multiplica no intestino médio de pulgas infectadas formando uma massa sólida que bloqueia o proventrículo (porção entre o esôfago e o estômago do inseto). Este bloqueio impede que o sangue proveniente do repasto chegue ao estômago. Como a pulga não consegue se alimentar, ela regurgita estas bactérias no local da picada transmitindo assim o agente etiológico para o hospedeiro (BACOT; MARTIN, 1914; SEBBANE et al., 2006).

Em humanos, os sintomas típicos da peste bubônica incluem febre, dores de cabeça e inchaço de nódulos linfáticos (bubão) (VIBOUD; BLISKA, 2005). Sem o tratamento com antibióticos, 50 a 60% das infecções bubônicas são letais. Sepses, coagulopatia disseminada e falência múltipla de órgãos são sintomas em estágios avançados da patologia. Ocasionalmente a forma bubônica pode progredir para a forma pneumônica que é transmitida diretamente entre humanos pela via respiratória. A forma pneumônica é mais letal que a forma bubônica. A morte neste caso dá-se tipicamente devido à falência do sistema respiratório ou sequela da sepsis o que inclui colapso circulatório, coagulopatia e hemorragia (SMILEY, 2008). Apesar de estarem disponíveis diversos tratamentos como vacinas e antibióticos, estes não são muito efetivos especialmente contra a forma pneumônica (DE LA PUERTA et al., 2009).

A transmissão das outras duas espécies patogênicas de *Yersinia* dá-se por via oral (ingestão de alimentos ou água contaminados) sendo que a bactéria usa como porta de entrada as células M das placas de Peyer do intestino delgado. A *Y. pseudotuberculosis* causa febre, sepsis e

dor abdominal aguda devido à adenite mesentérica. A *Y. enterocolitica* causa distúrbios gastrointestinais que variam desde enterite aguda à linfadenite mesentérica (BLEVES; CORNELIS, 2000). As formas de transmissão das espécies de *Yersinia* patogênicas para o homem são descritas na figura 3.

Os fatores de virulência da *Yersinia enterocolitica* incluem:

- proteínas da membrana externa, responsáveis pela invasão e adesão;

- o sistema de secreção do tipo III que é formado por 29 proteínas denominadas Ysc, cuja principal função é secretar proteínas conhecidas como Yop (*Yersinia outer membrane proteins*).

- proteínas secretadas, que podem ser divididas em dois grupos. O primeiro grupo (YopB e YopD) forma um poro na célula do hospedeiro. O segundo grupo (YopH, YopE, YopO, YopP e YopM) é injetado no citosol da célula do hospedeiro onde efetuam funções diversas;

- uma enterotoxina (Yst) que estimula a síntese de GMP cíclico na borda da mucosa intestinal causando diarreia nos pacientes infectados;

- captação de ferro através de um sideroforo denominado de yersiniabactina que tem alta afinidade pelo ferro e assim pode removê-lo de várias proteínas de mamíferos (TRABULSI; MARTINEZ, 2005).

As três espécies de *Yersinia* patogênicas apresentam em comum um tropismo pelo tecido linfático, a capacidade de resistir à resposta imune não específica do hospedeiro e um plasmídeo de alta massa molecular conhecido como pYV que contém os genes que codificam as proteínas Ysc e Yop (BLEVES; CORNELIS, 2000; TRABULSI; MARTINEZ, 2005).

A fosfotirosina fosfatase YopH é uma das proteínas secretadas pelo sistema de secreção do tipo III. Esta fosfatase é sintetizada pelas três espécies de *Yersinia* patogênicas para o homem. A introdução de YopH em células fagocitárias do hospedeiro causa a inibição da resposta inflamatória à bactéria através de um processo que envolve a quebra de adesões focais, inibição da fagocitose, liberação de fator de necrose α e resposta oxidativa. A YopH também impede a função dos linfócitos B e T prevenindo a resposta imune adaptativa, o que é crucial para a sobrevivência da bactéria nos nódulos linfáticos do hospedeiro (DE LA PUERTA et al., 2009).

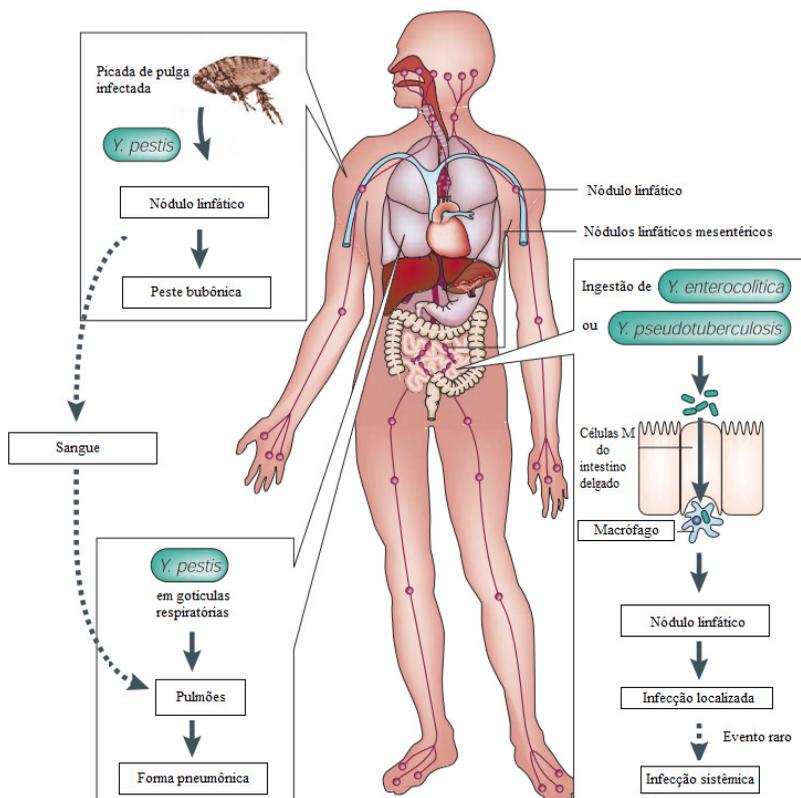


Figura 3: Vias de transmissão das espécies de *Yersinia* patogênicas para humanos. A *Y. pestis* é transmitida através de picadas de pulgas infectadas. Esta espécie de *Yersinia* causa a peste bubônica que eventualmente pode progredir para a peste pneumônica. Neste caso a transmissão dá-se por gotículas respiratórias de humano para humano. Nas outras duas espécies, *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*, a transmissão ocorre por via oral. Estas bactérias penetram através das células M do intestino delgado, atingem os nódulos linfáticos onde podem causar infecção localizada ou, em casos raros, infecção sistêmica. Adaptado de (WREN, 2003).

1.4 Proteínas Tirosina Fosfatases (PTPs)

A fosforilação de proteínas é um dos principais mecanismos de modificação pós-traducional utilizado pelas células para controlar vários de seus processos regulatórios. Este mecanismo torna-se, portanto, um elemento importante na via de transdução intracelular de sinais

desencadeados por efetores extracelulares como hormônios, mitógenos, citocinas etc (BARFORD; JIA; TONKS, 1995).

A remoção ou adição de um grupamento fosfato à uma proteína pode gerar um motivo de interação proteína-proteína, controlar a estabilidade protéica e, principalmente, modular a atividade enzimática (ZHANG, 2002). Aproximadamente 30% das proteínas celulares possuem uma ligação fosfato covalente (COHEN, 2000) e esta ocorre principalmente nos resíduos de serina e treonina. Apesar de uma pequena parcela das reações de fosforilação ocorrer nos resíduos de tirosina, sua importância não é menos relevante. Sabe-se que a fosforilação neste resíduo é essencial no controle do crescimento celular, metabolismo, comunicação célula-célula, migração celular, transcrição gênica, resposta imune, entre outros (HUNTER, 2000).

O equilíbrio dinâmico do nível de fosforilação em resíduos de tirosina das proteínas celulares é mantido por duas famílias de enzimas, as proteínas tirosina cinases (PTK, do inglês *protein tyrosine kinase*) e as proteínas tirosina fosfatases (PTP, do inglês *protein tyrosine phosphatase*). Estas duas famílias de enzimas possuem funções antagônicas. As tirosina cinases catalisam a transferência do grupo gama-fosfato do ATP para o resíduo de tirosina da proteína alvo, enquanto que as tirosina fosfatases catalisam a remoção deste grupo das proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina (BARFORD; DAS; EGLOFF, 1998).

As proteínas tirosina fosfatases podem ser divididas em três principais subfamílias: tirosina-específicas (do tipo receptor ou citoplasmática), de especificidade dupla (DSP) e de baixa massa molecular (LMW-PTPs do inglês *Low molecular weight*).

As tirosina-específicas do tipo receptor, exemplificada pela fosfatase CD45 de leucócito, geralmente possuem um domínio extracelular, uma única região transmembranar e um ou dois domínios catalíticos citoplasmáticos (BURKE JR; ZHANG, 1998). As tirosina-específicas citoplasmáticas, também chamadas de solúveis ou não receptoras, possuem domínios ou regiões não catalíticas que desempenham um papel no alocamento subcelular, na regulação da atividade enzimática ou no recrutamento de ligantes específicos (TABERNEIRO et al., 2008). As proteínas PTP1B humana e a YopH de *Yersinia enterocolitica* são tirosina fosfatases citoplasmáticas.

As tirosina fosfatases de especificidade dupla (DSPs) tem como substrato não somente proteínas contendo resíduos de tirosina fosforilados, como também resíduos de serina e treonina fosforilados.

Além disso, estas fosfatases podem ser subdivididas em: fosfatases de MAP-quinase; miotubularinas, fosfatases relacionadas a PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), PRL (*phosphatase of regenerating liver*), Cdc14s (*cell division cycle*) e DSPs atípicas (ALONSO et al., 2004; PULIDO; VAN HUIJSDUIJNEN, 2008). A fosfotirosina fosfatase PtpB de *Mycobacterium tuberculosis* é um exemplo de uma fosfatase duoespecífica.

Os membros da subfamília das tirosina fosfatases de baixa massa molecular são enzimas de aproximadamente 18 kDa que possuem o motivo catalítico próximo da região amino-terminal. Esta subfamília de tirosina fosfatase apresenta pouca similaridade com os membros das demais subfamílias (BARFORD; JIA; TONKS, 1995; RAUGEI; RAMPONI; CHIARUGI, 2002). A PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* é um representante das LMW-PTPs.

Apesar da diversidade na sequência de aminoácidos e especificidade por substrato, as PTPs conservam o motivo catalítico formado pela sequência (H/V)C(X)₅R (também conhecido como P-loop) e utilizam um mesmo mecanismo para realizar a catálise (ZHANG, 2001).

O mecanismo catalítico das PTPs envolve dois ataques nucleofílicos via S_N2 (figura 4). O primeiro ataque é feito pelo átomo de enxofre presente na cisteína catalítica da enzima. O segundo ataque é feito por uma molécula de água. Outra particularidade da reação é a formação de um intermediário tio-fosfato (BARFORD; JIA; TONKS, 1995; BURKE JR; ZHANG, 1998).

1.5 Inibidores de fosfotirosina fosfatases

Devido à importância das fosfatases em vários processos celulares, esta classe de proteínas emergiu como um alvo potencial para fármacos.

Estudos sobre as fosfatases PtpB e PtpA de *Mycobacterium tuberculosis* mostram que estas duas enzimas são importantes na sobrevivência desta bactéria no interior de macrófagos (KOUL et al., 2004; BACH et al., 2008; ZHOU et al., 2010) e despontam assim como possíveis alvos para o tratamento da tuberculose. Recentemente nosso grupo relatou que 5 chalconas sintéticas mostraram-se seletivas para a PtpA, das quais uma conseguiu reduzir em 77% a carga bacteriana em macrófagos (MASCARELLO et al., 2010).

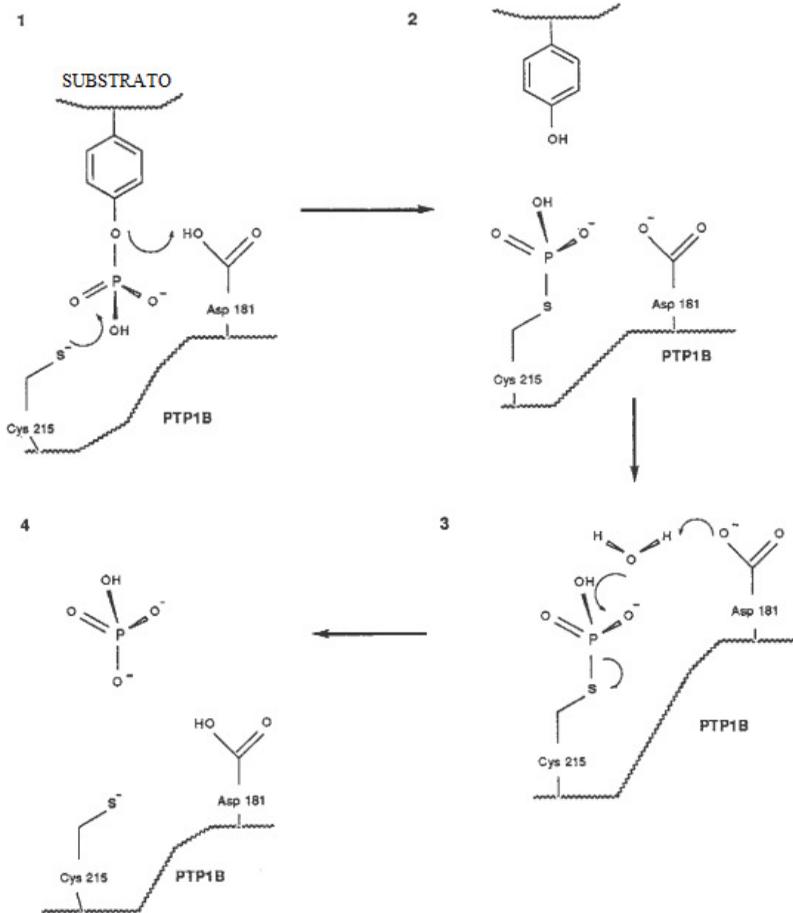


Figura 4: Mecanismo catalítico da PTP1B, uma fosfotirosina fosfatase humana. O primeiro passo da reação de catálise é o ataque nucleofílico via S_N2 do átomo de enxofre (da cisteína catalítica 215 da PTP1B) ao grupamento fosfato do resíduo de tirosina fosforilado. Além disso há a uma protonação do átomo de oxigênio do substrato fenólico pela cadeia lateral do aminoácido aspartato 181 da PTP1B. No segundo passo ocorre a liberação da proteína substrato e a formação de um intermediário tio-fosfato. No terceiro passo uma molécula de água, deprotonada pelo aspartato 181, ataca o fósforo do intermediário tio-fosfato em uma segunda reação via S_N2 . No quarto passo o fosfato é liberado deixando a cisteína 215 livre. Adaptado de (BARFORD; JIA; TONKS, 1995)

A PTP1B é outro alvo importante para o desenvolvimento de fármacos. Esta fosfatase participa no controle da massa corpórea, homeostase da glicose e dispêndio de energia. Ela atua como regulador negativo das vias de sinalização de receptores mediados por leptina e insulina (LIU et al., 2008). Como a atividade desta enzima é de grande importância, é justificável o interesse no desenvolvimento de inibidores para PTP1B quando a atividade desta encontra-se desregulada em distúrbios metabólicos como diabetes e obesidade (COOK; UNGER, 2002; RAJALA et al., 2009).

Recentemente o estudo de YopH tem despertado o interesse de nosso grupo. Esta fosfatase, sintetizada pelas três espécies de *Yersinia* patogênicas para o homem, é de grande importância na patogenicidade destas bactérias. Devido a esta importância, YopH desponta no âmbito de desenvolvimento de fármacos como um alvo promissor.

1.6 Arsenato redutases

O arsênio é um semimetal que possui dois estados de oxidação biologicamente relevantes: o arsenato As (V) e o arsenito As (III) (MUKHOPADHYAY et al., 2009). Este semimetal é requerido em baixa concentração para o crescimento e metabolismo microbológico, mas é tóxico em concentrações elevadas (STOLZ; BASU; OREMLAND, 2002).

Os organismos podem assimilar o As (V) via transportadores de fosfato e o As (III) através de aquagliceroporinas (ROSEN, 2002). No interior das células o As (III) pode se ligar às proteínas através da ligação ao grupo tiol de resíduos de cisteína ou ao nitrogênio imidazólico de resíduos de histidina. Na forma pentavalente, o arsenato compete com o fosfato, particularmente no ciclo do ácido cítrico, e altera a produção de ATP (LI; HAILE; KENNELLY, 2003).

Devido à interferência do arsênio nos processos biológicos, diferentes organismos desenvolveram sistemas de detoxificação para este semimetal. Dois sistemas são descritos na literatura, o primeiro, que é o principal meio de detoxificação em mamíferos, é através da metilação tanto do arsenato quanto do arsenito. Neste processo de detoxificação, a glutatona reduz o arsenato à arsenito que pode então, através de uma metiltransferase, receber um grupo metil da S-adenosil-metionina (STOLZ; BASU; OREMLAND, 2002).

O segundo sistema é encontrado tanto em procaríotos (JI et al., 1994) quanto em eucariotos (MUKHOPADHYAY; SHI; ROSEN, 2000; ZHOU et al., 2004). Neste sistema ocorre a conversão do As (V) a As (III) através de enzimas conhecidas como arsenato redutases (ArsC). Em

ensaios *in vitro* esta conversão é feita em um sistema de oxi-redução no qual o NADPH é oxidado a NADP. Esta oxidação pode ser acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm.

As arsenato redutases podem ser divididas em três famílias. A primeira família tem como representante a arsenato redutase codificada pelo plasmídeo R773 de *E. coli*. Esta enzima utiliza como redutores no sistema de oxi-redução a glutaredoxina e a glutatona (GLADYSHEVA; ODEN; ROSEN, 1994).

A segunda família é representada pelo produto do gene *arsC* do plasmídeo pI258 de *Staphylococcus aureus*. Esta enzima tem duas cisteínas que participam na catálise e utiliza como redutor a tioredoxina. Em 2001, Zegers e seu grupo demonstraram que esta enzima de *Staphylococcus aureus* também possui atividade de fosfatase e apresenta homologia à fosfotirosina fosfatases de baixa massa molecular (ZEGERS et al., 2001).

A terceira família de arsenato redutases também apresenta homologia às tirosina fosfatases, mas àquelas pertencentes à subfamília de especificidade dupla. As seguintes arsenato redutases fazem parte desta família: ScAcr2p de *Saccharomyces cerevisiae*; AtACR2 de *Arabidopsis thaliana*, PvACR2 de *Pteris vittata*, entre outras. Estas enzimas também utilizam a glutatona e a glutaredoxina como agentes redutores (BHATTACHARJEE et al., 2010).

Fármacos a base de arsênio e antimônio são utilizados no tratamento de tripanosomíases e leishmanioses. Em 2004, Zhou e seu grupo mostraram que amastigotas de *Leishmania infantum* originárias de promastigotas transfectadas com o plasmídeo pSP-LmACR2—HYG (codificante da arsenato redutase LmACR2 de *Leishmania major*), exibiam uma maior sensibilidade ao fármaco Pentostam comparadas àquelas amastigotas provenientes de promastigotas transfectadas somente com o vetor pSP α HYG α . O Pentostam é um pró-fármaco a base de antimônio pentavalente, Sb(V). Para formar a substância ativa o antimônio Sb (V) deve ser reduzido a antimônio Sb (III). Zhou e seu grupo sugeriram, como ponto de partida de seu trabalho, que como o Sb (V) e o As (V) possuem propriedades semelhantes e compartilham das mesmas vias de transporte para o interior da célula, uma arsenato redutase seria responsável pela conversão do pró-fármaco na substância ativa. Neste estudo eles comprovaram que esta arsenato redutase era realmente capaz de reduzir tanto o Sb (V) quanto o As (V) às respectivas formas (III) (ZHOU et al., 2004). Dois anos após sua descoberta, Zhou publicou outro artigo mostrando que a arsenato

redutase LmACR2 também tinha uma atividade de fosfotirosina fosfatase (ZHOU; BHATTACHARJEE; MUKHOPADHYAY, 2006).

Em 2003, Li e seu grupo publicaram um artigo sobre uma arsenato redutase de *Synechocystis* cepa PCC 6803. Esta proteína possui características estruturais semelhantes às tirosinas fosfatases de baixa massa molecular e à arsenato redutase de *Staphylococcus aureus*. Eles verificaram que a proteína em estudo mostrava uma baixa atividade de fosfatase ($V_{max} = 0,08 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$) e uma expressiva atividade de arsenato redutase ($V_{max} 3,1 \mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$). Outro fato interessante foi que esta enzima não utilizava a tioredoxina como agente redutor, mas a glutaredoxina e a glutatona (LI; HAILE; KENNELLY, 2003). Baseado nos resultados obtidos em seu trabalho, Li e seu grupo propuseram um mecanismo catalítico para a arsenato redutase SynArsC de *Synechocystis* sp. o qual é mostrado na figura 5.

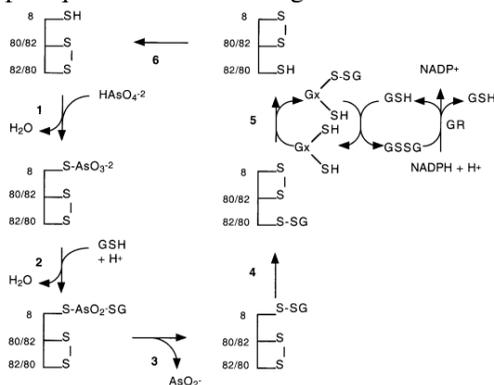


Figura 5. Possível mecanismo catalítico para SynArsC de *Synechocystis* sp. cepa PCC6803. Neste mecanismo a arsenato redutase forma um intermediário arsenoenzima no passo 1. No passo 2 este intermediário é atacado pela glutatona reduzida (GSH) para formar o intermediário cisteinil-arsenoglutatona. No passo 3 o intermediário formado no passo anterior se quebra gerando arsenito e uma ponte dissulfeto entre a cisteína catalítica da enzima (Cys₈) e a glutatona. No passo 4 ocorre uma troca de posição da ponte dissulfeto (entre a cisteína catalítica e as cisteínas 80 e 82) e da posição da glutatona. Esta modificação faz com que a glutatona saia do sítio catalítico e seja posicionada em um ponto próximo à superfície da enzima. A ponte dissulfeto entre a enzima e a glutatona é então reduzida no passo 5 pela ação da glutaredoxina com conseqüente oxidação de NADPH à NADP. No passo 6 ocorre uma realocação da ponte dissulfeto na arsenato redutase o que culmina com a restauração da cisteína catalítica ao seu estado reduzido, reiniciando assim o ciclo. Fonte: (LI; HAILE; KENNELLY, 2003).

Bennett e seu grupo, ao trabalharem com uma arsenato redutase de *Bacillus subtilis*, viram que esta era estruturalmente e funcionalmente similar à tirosina fosfatase de baixa massa molecular bovina. A arsenato redutase de *B. subtilis* apresenta cerca de 65% de identidade com a arsenato redutase de *S. aureus*. Com base nos resultados obtidos na cristalização da proteína, os autores do trabalho propuseram um mecanismo catalítico para a arsenato redutase (figura 6) o qual mostra a participação da tiorredoxina como agente redutor (BENNETT et al., 2001).

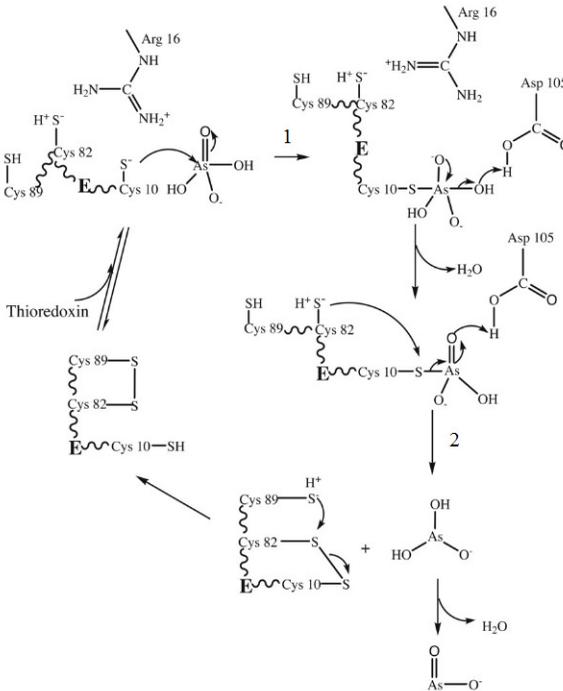


Figura 6. Mecanismo catalítico proposto para arsenato redutases de bactérias Gram-positivas. O primeiro passo é muito semelhante ao que ocorre no mecanismo catalítico das tirosina fosfatases. Ocorre um ataque nucleofílico da cisteína catalítica Cys_{10} no arsenato formando um intermediário enzima-substrato e liberando uma molécula de água como grupo de saída. Posteriormente este intermediário é atacado pelo grupo tiossulfato da cisteína adjacente Cys_{82} . O segundo passo é a redução da ligação da proteína ao arsenato gerando o arsenito e uma ponte dissulfeto entre as cisteínas 10 e 82. Esta ponte é posteriormente realocada liberando a cisteína catalítica Cys_{10} . Finalmente, a ponte dissulfeto entre a cisteína 89 e 82 é desfeita pela tiorredoxina que reduz estas cisteínas, reiniciando o ciclo. Fonte: (BENNETT et al., 2001).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivos principais a caracterização bioquímica de uma fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi* e a busca de inibidores para a tirosina fosfatase de *Yersinia enterocolitica* (YopH).

2.2 Objetivos específicos

- Expressar a tirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi* em *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS;
- Expressar a tirosina fosfatase (YopH) de *Yersinia enterocolitica* em *Escherichia coli* BL21(DE3);
- Purificar as proteínas e confirmar suas identidades;
- Analisar a atividade catalítica da tirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi* com e sem a cauda de histidina na região amino-terminal, tanto de sua possível atividade de fosfatase quanto de arsenato redutase;
- Analisar a atividade catalítica da tirosina fosfatase (YopH) de *Yersinia enterocolitica*;
- Avaliar compostos orgânicos (chalconas, hidrazidas, oxadiazóis, sulfonilhidrazonas, sulfonamidas) como inibidores da fosfotirosina fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Transformação das bactérias *E. coli*

3.1.1 Preparação de células competentes para transformação

A metodologia baseada no protocolo descrito por Ausubel e colaboradores (AUSUBEL et al., 1995) foi utilizada na obtenção de células competentes. Através desta metodologia induz-se a competência das bactérias por tratamento químico com cálcio, o qual altera a permeabilidade das membranas da bactéria facilitando assim, a aceção do DNA plasmidial.

Bactérias *E. coli* BL21(DE3) e BL21(DE3)pLysS foram semeadas por esgotamento individualmente em placas de Petri contendo LB-ágar (NaCl 1 %, peptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, ágar 2 % pH 7,5), em seguida as placas foram colocadas a 37 °C por um período de 16 horas. Após este período, uma colônia de cada cepa foi então transferida, separadamente, para 50 mL de meio LB (NaCl 1 %, peptona 1 %, extrato de levedura 0,5 %, pH 7,5), que foi deixado sob agitação a 37 °C até que fosse atingida a densidade óptica de 0,4 no comprimento de onda de 600 nm. As células foram então centrifugadas (6.000 g por 20 minutos) e o meio LB descartado. O sedimento de células foi ressuspenso em 25 mL de CaCl₂ 0,1 M a 4 °C e incubado em gelo por 1 hora. Em seguida as células foram novamente centrifugadas. O sedimento foi homogeneizado em 5 mL de CaCl₂ 0,1 M a 4 °C contendo glicerol 20 % e incubado por 30 minutos em gelo. Posteriormente as bactérias foram separadas em alíquotas de 150 µL e armazenadas a -80 °C.

3.1.2 Transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS com os vetores pDEST17-PTP e pTH24-TEV_{SH}.

O gene que codifica a proteína fosfotirosina fosfatase putativa de *T. cruzi* está inserido no vetor pDEST17, o qual lhe confere uma cauda de histidina na região amino-terminal da proteína expressa e um sítio de clivagem TEV. Este vetor nos foi fornecido pelo grupo do professor

Samuel Goldenberg (Instituto de Biologia Molecular do Paraná-IBMP, Brasil).

O vetor pTH24-TEV_{SH} que contém a seqüência de nucleotídeos da protease TEV, foi obtido do grupo de Helena Berglund (Instituto Karolinska, Suécia).

Na transformação, 50 ng dos plasmídeos foram adicionados separadamente, a 150 µL de BL21(DE3)pLysS competentes. Estas células foram mantidas em gelo (4 °C) por 20 minutos e em seguida foram colocadas à temperatura de 42 °C por dois minutos seguido de 2 minutos novamente em gelo. Após esse período, 500 µL de meio LB foram adicionados às células que em seguida foram mantidas a 37 °C por 1 hora. As bactérias foram então, semeadas em meio ágar contendo cloranfenicol (50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) e mantidas à temperatura de 37 °C por 16 horas.

3.1.3 Transformação de bactérias *E. coli* BL21(DE3) com os vetores p7-7Yop51*Δ162 e PET101/D-TOPO-GRX1.

O vetor p7-7Yop51*Δ162 (fornecido pelo professor Tiago A. S. Brandão da Universidade Federal de Minas Gerais) codifica a proteína YopH de *Yersinia enterocolitica*.

O vetor PET101/D-TOPO-GRX1 foi fornecido pelo professor Peter J. Kennelly da Universidade de Virgínia nos Estados Unidos. Este vetor codifica a proteína glutaredoxina 1 de *E. coli* que foi utilizada nos testes de arsenato redutase da fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi*.

A transformação com estes dois vetores deu-se da mesma forma descrita anteriormente, a única modificação foi a utilização de somente o antibiótico ampicilina no meio LB ágar.

3.2 Expressão das proteínas recombinantes

3.2.1 Expressão da fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi*

Para expressar a proteína tirosina fosfatase putativa, bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor de expressão

pDEST17-PTP foram cultivadas a 37 °C em meio LB suplementado com os antibióticos cloranfenicol (50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). Quando a densidade óptica atingiu 0,6 a 600 nm foi adicionado IPTG até a concentração final de 0,5 mM. As bactérias foram então deixadas sob agitação a 15 °C por 16 horas. Após este período as células foram centrifugadas (6000 g a 4 °C) por 20 minutos. O meio LB foi então descartado e o sedimento foi armazenado a -20 °C.

3.2.2 Expressão da protease TEV

A expressão da protease TEV foi semelhante a expressão da fosfotirosina fosfatase putativa de *T. cruzi*. No caso da TEV as bactérias utilizadas foram BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor de expressão pTH24-TEV_{SH}, a concentração final de IPTG foi de 1 mM e a temperatura de indução foi de 20 °C.

3.2.3 Expressão da proteína glutaredoxina 1 de *E. coli*

Bactérias *E. coli* BL21(DE3) contendo o vetor PET101/D-TOPO-GRX1 foram cultivadas a 37 °C em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) até que se atingisse a densidade óptica de 0,6 a 600 nm. O IPTG foi então adicionado até a concentração final de 1 mM. O cultivo foi mantido a 37 °C por 3 horas e depois foi centrifugado. O sedimento foi então guardado a -20 °C.

3.2.4 Expressão da proteína YopH de *Yersinia enterocolitica*

Para expressar a fosfatase YopH, bactérias transformadas com o vetor p7-7Yop51*Δ162 foram cultivadas a 37 °C em meio LB contendo ampicilina (100 µg/mL) até que se atingisse a densidade óptica de 0,8 a 600 nm. Posteriormente, a indução foi feita acrescentando IPTG até a concentração final de 0,4 mM. O cultivo foi mantido à temperatura de 25 °C durante 16 horas. O cultivo foi então centrifugado e o sedimento foi guardado a -20 °C.

3.3 Purificação das proteínas recombinantes

3.3.1 Purificação da fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi*

O precipitado de bactérias obtido após o cultivo foi homogeneizado em 3 mL do tampão A (Tris-HCL 20 mM, pH 8, NaCl 500 mM, glicerol 10 %) contendo fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF - inibidor de protease) na concentração final de 40 µg/mL. Logo após as células foram rompidas por sonicação (Fisher Scientific Model Sonic Dismembrator) em 7 ciclos de 20 segundos em gelo. O conteúdo obtido após a sonicação foi em seguida, centrifugado a 4 °C por 40 minutos a 16.000 g. O sobrenadante, contendo proteínas solúveis, obtido após a centrifugação foi então injetado no sistema ÄKTA(GE Healthcare) ao qual estava conectada uma coluna HisTrap (Amersham Biosciences) de 1 mL.

A purificação da proteína foi feita por cromatografia de afinidade ao metal imobilizado. A coluna HisTrap possui o Ni⁺² acoplado à matriz de sefarose. Este metal forma complexos com aminoácidos carregados positivamente como por exemplo, a histidina. Ao formar o complexo, a proteína com cauda de histidina fica retida enquanto que as demais proteínas que não interagem com o metal são eluídas com o tampão. Para que a proteína de interesse seja então eluída, aumenta-se a concentração de imidazol no tampão de eluição. O imidazol é um alcalóide heterocíclico aromático que compete quimicamente com a histidina pelo níquel.

Os tampões utilizados na purificação foram: Tampão A e Tampão B (Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 500 mM, glicerol 10 %, imidazol 500 mM, β-mercaptoetanol 1 mM). Após a purificação, as frações eluídas referente ao pico da fosfotirosina fosfatase putativa foram reunidas e postas para dialisar durante 2 horas em cada um dos seguintes tampões: tampão de diálise A (Tris-HCL 20 mM, pH 8; NaCl 500 mM; DTT 5 mM; glicerol 10 %; imidazol 150 mM), tampão de diálise B (Tris-HCL 20 mM, pH 8; NaCl 500 mM; DTT 5 mM; glicerol 10 %; imidazol 75 mM), tampão de diálise C (Tris-HCL 20 mM, pH 8; NaCl 250 mM; DTT 5 mM; glicerol 10 %; Imidazol 35 mM), tampão de diálise D (Tris-HCL 20 mM, pH 8; NaCl 50 mM; EDTA 5 mM; DTT 5 mM; glicerol 20 %).

Depois de dialisada a proteína foi concentrada (Amicon Ultra-15 Millipore, membrada de 10 kDa). Em seguida a proteína foi quantificada pelo método de Bradford utilizando a soro albumina bovina (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976; FIGUEIREDO DA SILVA et al., 2007), separada em frações e colocadas a -20 °C.

3.3.2 Purificação da protease TEV

Todo o processo realizado para purificar a fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi* foi também realizado para purificar a protease TEV.

3.3.3 Purificação da glutaredoxina 1 de *E. coli*

A metodologia utilizada para purificar a glutaredoxina 1 de *E. coli* foi muito semelhante àquela utilizada para purificar a TEV e a PTP putativa de *T. cruzi*.

Os fatores que divergiram foram: o pH dos tampões de purificação da glutaredoxina 1 é 7,5 e a diálise desta proteína ocorre em uma única etapa com tampão de diálise da glutaredoxina (Tris-HCl 20 mM pH 7,5; EDTA 0,5 mM; DTT 1mM).

3.3.4 Purificação da YopH da *Yersinia enterocolitica*

O precipitado obtido após o cultivo foi homogeneizado em 3 mL do tampão Y (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7; NaCl 100 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM) contendo PMSF na concentração final de 40 µg/mL. Em seguida as células foram rompidas por sonicação em 7 ciclos de 20 segundos em gelo. O conteúdo obtido após a sonicação foi então centrifugado, a 4 °C por 40 minutos a 16000 g. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi então injetado no sistema ÄKTA(GE Healthcare) ao qual estava conectada uma coluna HiTrap™ SP HP (Amersham Biosciences) de 5 mL.

Os tampões utilizados na purificação foram os tampões Y e Y⁺ (Acetato de sódio 100 mM pH 5,7; NaCl 500 mM; EDTA 1 mM e DTT 1 mM).

A purificação da proteína Yop51* Δ 162 foi realizada pelo método de cromatografia de troca iônica. A coluna HiTrap™ SP HP é uma coluna trocadora de cátions, carregada com radicais $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$. No pH dos tampões de purificação a YopH se encontra com cargas positivas (pH abaixo do ponto isoelétrico) e é atraída pelos radicais $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$ presentes na coluna, as demais proteínas são então eluídas com o tampão. Com o acréscimo de cargas positivas devido ao aumento da concentração de NaCl do tampão Y^+ a proteína de interesse é então liberada da coluna.

Após a purificação a YopH foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), separada em frações e colocadas a -20°C .

3.4 Clivagem da fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi* com a protease TEV

Com a finalidade de verificar se a cauda de histidina interferia na atividade catalítica da enzima, a cauda de histidina da fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi* foi clivada com a protease TEV.

Para a clivagem da cauda de histidina foi utilizado o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 0,5 mM e DTT 0,5 mM. As proteínas foram colocadas na seguinte proporção: 10 μg de PTP para cada 3 μg de TEV. A reação foi deixada por 24 horas sob agitação a 4°C .

3.5 Separação da fosfotirosina fosfatase putativa da protease TEV e da cauda de histidina

Com o objetivo de separar a fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi* da protease TEV e da cauda de histidina foram testados dois métodos diferentes.

O primeiro método trata-se de uma cromatografia de exclusão molecular utilizando a coluna Superdex 200 16/60, para a qual foi utilizado o tampão de diálise D como eluente. Na cromatografia de exclusão molecular a mistura de proteínas passa por uma coluna que é formada por polímeros que possuem pequenas cavidades. Ao contrário

das moléculas grandes, as moléculas pequenas conseguem entrar e sair destas cavidades ficando assim mais tempo retidas na coluna. As moléculas grandes são então eluídas primeiro seguida das menores, ocorrendo assim a separação por tamanho molecular.

O segundo método utilizado na purificação da PTP foi uma cromatografia de afinidade em uma coluna HisTrap a qual reteria a TEV e a cauda de histidina liberando assim a PTP putativa clivada.

3.6 Modelagem computacional da estrutura da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

De forma a obter informações adicionais sobre a PTP de *T. cruzi*, sua estrutura foi modelada computacionalmente pelo professor adjunto no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Lucas Bleicher.

A modelagem computacional foi feita utilizando um método híbrido (modelagem por homologia e alinhamento). A modelagem por homologia é uma técnica computacional que é capaz de inferir uma estrutura tridimensional de proteína a partir de uma proteína homóloga com estrutura determinada experimentalmente. Esse método necessita de um alinhamento de seqüências entre a proteína que se deseja modelar e a proteína com estrutura já determinada (denominada proteína molde). A partir desse alinhamento, que determina que posições entre as duas proteínas são equivalentes, é gerado um modelo inicial em que cada resíduo da proteína molde é substituído por aquele da proteína a ser modelada, e as regiões sem equivalência no alinhamento (correspondentes aos gaps) são inseridas ou eliminadas. Em geral esse modelo inicial apresenta características físicas que não correspondem àquelas observadas em estruturas reais, como choques estéricos entre resíduos, ângulos de ligação não permitido ou resíduos desconectados. Desta forma, os softwares dedicados à modelagem por homologia submetem esse modelo a uma minimização energética, isto é, aplica-se um modelo físico (REMO) para interação entre átomos numa proteína de forma a encontrar uma conformação que minimize a energia do modelo, de acordo com as configurações observadas na natureza.

Já a modelagem por alinhamento (do inglês *threading*) consiste na utilização de não um molde, mas uma série de candidatos à moldes para cada região da estrutura da proteína. Ele não parte de um alinhamento, e sim faz uma busca completa contra todas os enovelamentos conhecidos de forma a encontrar em quais deles a

seqüência a ser modelada apresenta as melhores características físico-químicas e geométricas. A partir dessa busca, o modelo é montado de forma a reproduzir as estruturas observadas, que podem inclusive ser de várias proteínas diferentes. Construído o modelo final por esse processo, ele é também minimizado energeticamente de forma a ajustar detalhes como pequenas reacomodações da cadeia principal e a orientação das cadeias laterais.

3.7 Teste de atividade de fosfatase da PTP putativa de *T. cruzi*

A atividade catalítica da enzima foi avaliada em diferentes tampões e diferentes pH. Os seguintes tampões foram testados: Imidazol 10 mM (pH 6; pH 7 e pH 8); Tris 50 mM pH8; Hepes 50 mM pH 7,5 e pH 8.

A atividade da PTP putativa de *T. cruzi* foi testada utilizando-se como substrato o composto p-nitrofenilfosfato (pNPP). Fosfotirosina fosfatases quando ativas são capazes de clivar este composto gerando em condições alcalinas o p-nitrofenol (pNP), que possui uma cor amarela. A reação pode ser então acompanhada através da medição do aumento da absorbância em 410 nm como conseqüência do aparecimento do p-nitrofenol.

O teste de atividade da proteína foi feito com o tampão a ser avaliado, pNPP 10 mM, β -mercaptoetanol 0,1 %. O volume final de reação foi de 200 μ L e as leituras das absorbâncias foram feitas em leitor de microplaca (TECAN INFINITE 200). O tempo de leitura foi de 40 minutos sendo que as leituras eram feitas a cada 30 segundos. A temperatura do teste foi de 37 °C.

Avaliou-se também se a cauda de histidina influenciava a atividade de fosfatase da enzima.

3.8 Teste de atividade de arsenato redutase

Como já foram descritas na literatura enzimas que possuem tanto atividade de fosfatase quanto de arsenato redutase (BENNETT et al., 2001; ZEGERS et al., 2001; ZHOU; BHATTACHARJEE; MUKHOPADHYAY, 2006), analisamos também se além da atividade

de fosfatase a PTP putativa de de *Trypanosoma cruzi* poderia ter uma atividade de arsenato redutase.

Foram avaliados os dois sistemas de oxi-redução descritos para redução do arsenato à arsenito pelas arsenato redutases.

No primeiro sistema a tioredoxina age como redutor e este sistema é utilizado em experimentos *in vitro* com arsenato redutases de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Este teste foi baseado no protocolo de Messens et al. (MESSENS et al., 1999). Neste experimento foram utilizados o tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Tiorredoxina de *E. coli* 0,42 μ M; Tiorredoxina redutase de *E. coli* 0,14 μ M; NADPH 125 μ M; concentrações variáveis de 125 μ M a 6, 25 mM de arsenato de sódio; fosfotirosina fosfatase putativa de *T. cruzi* em concentrações que variaram de 2,16 μ M a 43 μ M. O volume final de reação foi de 200 μ L e as leituras das absorbâncias foram feitas a cada 30 segundos durante 5 minutos em leitor de microplaca (TECAN INFINITE 200) à 340 nm e à temperatura de 37 °C.

No segundo sistema a glutathione e a glutaredoxina agem como redutores e este sistema é utilizado em experimentos *in vitro* com arsenato redutases de organismos como *Pteris vittata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Leishmania major*, entre outros. Este teste foi baseado no protocolo de Li et al. (LI; HAILE; KENNELLY, 2003). Neste experimento foram utilizados o tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; BSA 0,02 mg; NADPH 0,25 mM; glutathione redutase de levedura 0,2 μ M; glutathione reduzida 8 mM; glutaredoxina de *E. coli* 4 μ M; arsenato de sódio 40 mM; fosfotirosina fosfatase putativa de *T. cruzi* em concentrações que variaram de 8 μ M a 37 μ M. Como no teste anterior, o volume final de reação foi de 200 μ L e as leituras das absorbâncias foram feitas a cada 30 segundos durante 5 minutos em leitor de microplaca (TECAN INFINITE 200) a 340 nm e a temperatura de 37 °C.

3.9 Triagem de inibidores para a fosfotirosina fosfatase (YopH) de *Yersinia enterocolitica*

Os compostos analisados na triagem de inibidores foram sintetizados pelos alunos: Louise Domeneghini Chiaradia, Kely Navakosky de Oliveira, Alessandra Mascarello, Marlon Norberto Sechini Cordeiro, Taisa Regina Stumpf que fazem parte do laboratório

Laboratório Estrutura e Atividade (LEAT) do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) coordenado pelos professores Ricardo José Nunes e Rosendo Augusto Yunes.

Foram testados 265 compostos: 204 chalconas sintéticas, 37 hidrazidas, 10 oxadiazóis, 12 sulfonilhidrazonas e 2 sulfonamidas. A estrutura de todos os compostos testados pode ser visualizada no apêndice A.

A triagem foi feita nas seguintes condições: tampão imidazol 20 mM pH 7; p-nitrofenolfosfato 20 mM; composto a ser avaliado 25 μ M; YopH 14 nM. Todos os compostos que foram triados eram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. Para excluir a possibilidade da inibição da enzima pelo dimetilsulfóxido, este solvente foi utilizado no controle negativo da reação, na concentração final de 2,5 %. O volume final de reação foi de 200 μ L e as leituras das absorbâncias foram feitas a cada minuto durante 10 minutos em leitor de microplaca (TECAN INFINITE 200) a 405 nm e à temperatura de 37 °C.

Depois de feita a triagem foram selecionados os inibidores que apresentavam uma porcentagem de inibição superior a 30 %.

3.10 Cálculo de IC₅₀

A IC₅₀ (metade da concentração máxima inibitória de um composto) mede a efetividade de um composto em inibir uma função biológica ou bioquímica. No caso em estudo verifica-se qual é a IC₅₀ do inibidor frente à função catalítica da enzima YopH de *Yersinia enterocolitica*.

No teste de IC₅₀ foram utilizadas concentrações crescentes de inibidor (de 10 μ M a 100 μ M) em um total de 5 concentrações. Para os 35 compostos selecionados na triagem as condições do teste foram as seguintes: tampão imidazol 20 mM pH 7; p-nitrofenilfosfato 20 mM; concentrações crescentes de inibidor; YopH 14 nM. O volume final de reação foi de 200 μ L e as leituras das absorbâncias foram feitas a cada minuto durante 10 minutos em leitor de microplaca (TECAN INFINITE 200) a 405 nm e à temperatura de 37 °C.

Os dados obtidos pelo leitor de microplaca foram analisados com o programa Microsoft Office Excel 7.0 e os valores de IC₅₀ foram determinados através do método de regressão linear de melhor ajuste.

Após a seleção dos inibidores que apresentaram valores de IC_{50} inferiores a $50 \mu\text{M}$, fez-se então um teste de IC_{50} com a incubação destes compostos por 10 minutos a 37°C com a YopH. Este teste foi feito com o intuito de verificar se a incubação nas condições descritas, influenciava nos valores obtidos para IC_{50} . As condições do teste foram as seguintes: concentrações crescentes de inibidor (de $5 \mu\text{M}$ a $50 \mu\text{M}$) em um total de 10 concentrações; tampão imidazol 20 mM pH 7; p-nitrofenilfosfato 20 mM ; YopH 14 nM . O volume final de reação foi de $200 \mu\text{L}$ e as leituras das absorbâncias foram feitas a cada minuto durante 10 minutos em leitor de microplaca (TECAN INFINITE 200) a 405 nm e à temperatura de 37°C .

Determinada a influencia da incubação do composto com a enzima a 37°C por 10 minutos nos valores de IC_{50} , fez-se então 3 repetições do teste em triplicata para cada um dos 4 inibidores para se obter os valores referentes à média e ao desvio padrão. O resultado da IC_{50} e o desvio padrão foram obtidos através do valor da média obtida a partir da média de cada uma das triplicatas.

3.11 Cinética enzimática

Após o cálculo de IC_{50} , estudos cinéticos foram realizados para cada inibidor para averiguar que tipo de inibição este exercia sobre a enzima.

A cinética da enzima na presença de DMSO foi utilizada como parâmetro na comparação com as cinéticas realizadas na presença de duas concentrações distintas do inibidor. As concentrações do inibidor utilizadas foram estipuladas para cada composto a partir do valor obtido no cálculo de IC_{50} . Na cinética enzimática também foi feito a incubação da enzima com o inibidor por 10 minutos a 37°C previamente à adição do substrato p-nitrofenilfosfato.

As condições do teste foram as seguintes: tampão imidazol 20 mM pH 7; p-nitrofenilfosfato em sete concentrações diferentes que variavam de $0,2 \text{ mM}$ a $12,8 \text{ mM}$; duas concentrações distintas de inibidor; YopH 14 nM . Assim como no cálculo de IC_{50} , o volume final de reação foi de $200 \mu\text{L}$ e as leituras das absorbâncias foram feitas a cada minuto durante 10 minutos em leitor de microplaca (TECAN INFINITE 200) a 405 nm e à temperatura de 37°C .

A absorptividade molar calculada experimentalmente do p-nitrofenol de $2249,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ foi utilizado para efetuar os cálculos.

Após os cálculos fez-se a construção do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver- Burk no qual é plotado o inverso do valor da velocidade (variação da absorbância convertida em unidades de concentração a partir do coeficiente de extinção molar que posteriormente é dividida pelo tempo de reação e pela quantidade de proteína em mg) versus os valores correspondentes ao inverso da concentração de pNPP. A partir deste gráfico obteve-se o K_m aparente para cada concentração do composto. Ao se plotar um gráfico dos K_m aparentes versus concentração do inibidor, a interceptação no eixo x da linha de tendência traçada corresponde a $-K_i$.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das proteínas recombinantes

4.1.1 Obtenção da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

A fosfotirosina fosfatase putativa de *Trypanosoma cruzi*, produto do gene Tc00.1047053503471.10, possui um ponto isoelétrico e massa molecular teóricos de 8,78 e 23,200 kDa, respectivamente. A estrutura primária referente à proteína expressa é mostrada na Figura 7.

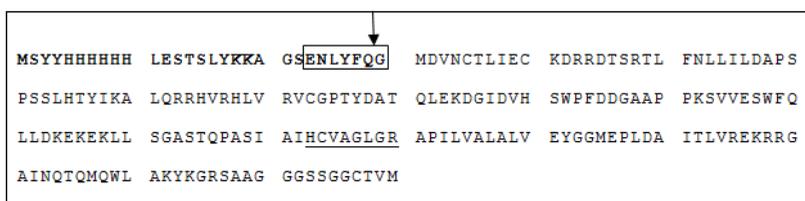


Figura 7. Estrutura primária da fosfotirosina fosfatase putativa de *T. cruzi*, com o provável sítio catalítico (sublinhado), a cauda de histidina (negrito), sequência reconhecida pela protease TEV (retângulo) e seu sítio de clivagem (seta).

No perfil cromatográfico da PTP putativa de *T. cruzi* na concentração de 10 mM de imidazol, pode-se notar um grande pico referente às proteínas que não interagiram com a resina (*flow through*). Com 60 mM de imidazol nota-se um segundo pico onde saíram outras proteínas que interagiram pouco com a resina. Finalmente, com 100 mM de imidazol a PTP putativa foi eluída, fato que pode ser observado pela presença de um terceiro pico no perfil. O perfil cromatográfico pode ser observado na figura 8.

Terminada a purificação, uma alíquota das amostras recolhidas foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 16% em condições redutoras e desnaturantes (SDS-PAGE). O gel foi corado com *Coomassie brilliant blue R-250* (figura 9).

No gel é possível verificar que a proteína é expressa principalmente na fração solúvel (grande banda entre 15 e 25 kDa na fração referente ao sobrenadante) e pouco expressa na fração insolúvel (precipitado). Nota-se também a eficiência do método de purificação utilizado (uma única banda na fração 2).

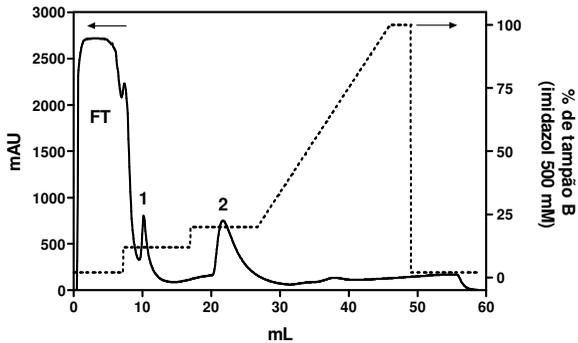


Figura 8: Perfil cromatográfico da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*. Linha cheia: absorbância a 280 nm; linha pontilhada: concentração de Tampão B (linha base correspondente a 10 mM de imidazol, primeiro, segundo e terceiro patamar correspondente a 60 mM, 100 mM e 500 mM de imidazol respectivamente); (FT) *flow through* proteínas que não interagiram com a resina; (1) pico correspondente às proteínas que interagiram pouco com a resina; (2) pico correspondente à proteína PTP putativa de *T. cruzi*.

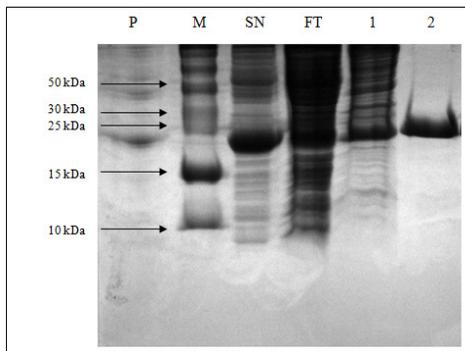


Figura 9. SDS-Page com as frações da purificação da PTP de *Trypanosoma cruzi*. (P) precipitado; (M) marcador de peso molecular, (SN) sobrenadante, (FT) proteínas que não interagiram com a resina; (1) proteínas eluídas com 60 mM de imidazol; (2) proteína eluída com 100 mM de imidazol.

Obteve-se um rendimento médio de 6,50 mg de proteína por litro de cultivo após o processo de purificação da PTP putativa de *T. cruzi* por cromatografia de afinidade ao metal imobilizado.

4.1.2 Obtenção da protease TEV

A protease TEV é uma proteína com massa molecular de 33 kDa. Esta protease reconhece uma sequência heptapeptídica estritamente específica: EXXXYXQ*S/G, onde X pode ser qualquer resíduo (CARRINGTON; DOUGHERTY, 1988).

O perfil cromatográfico da proteína (figura 10) mostra que esta foi eluída com aproximadamente 210 mM de imidazol. O SDS-PAGE da TEV (figura 11) mostra a obtenção de uma proteína pura e de massa molecular mais baixa do que 36 kDa, de acordo com o valor esperado.

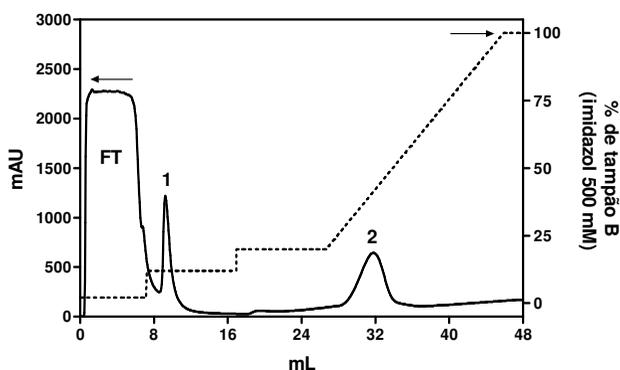


Figura 10. Perfil cromatográfico da purificação da protease TEV. (FT) proteínas que não interagiram com a resina; (1) pico correspondente às proteínas que interagiram pouco com a resina; (2) eluição da protease TEV.

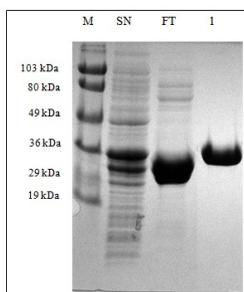


Figura 11. SDS-Page correspondente à purificação da protease TEV. (M) marcador de peso molecular; (SN) sobrenadante; (FT) proteínas que não interagiram com a resina; (1) eluição da protease TEV com 210 mM de imidazol.

4.1.3 Obtenção da glutaredoxina 1 de *E. coli*

A proteína codificada pelo vetor PET101/D-TOPO-GRX1 possui massa molecular teórica de 12 kDa.

O perfil cromatográfico da purificação da proteína (figura 12) mostra que a mesma elui com 100 mM de imidazol, fato comprovado pelo SDS Page (figura 13).

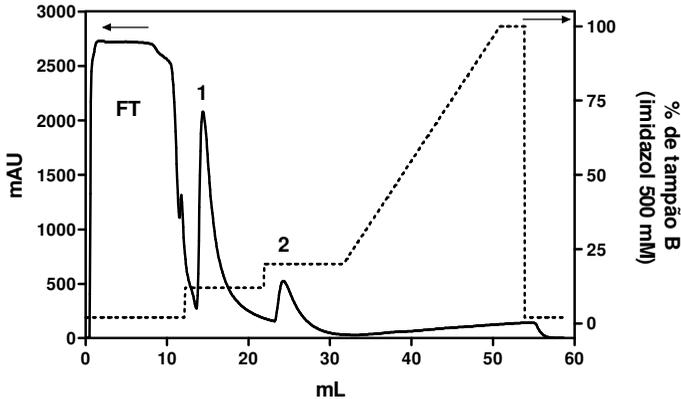


Figura 12. Perfil cromatográfico da purificação da glutaredoxina 1 de *E. coli*. (FT) proteínas que não interagiram com a resina; (2) proteínas que interagiram pouco com a resina; (3) eluição da glutaredoxina com 100 mM de imidazol

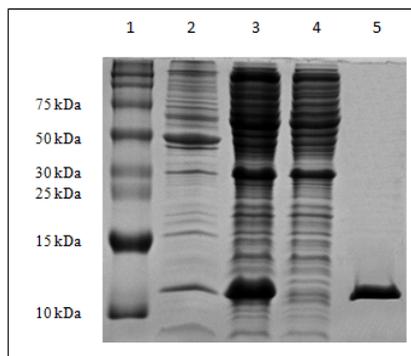


Figura 13. SDS-Page da purificação da glutaredoxina 1 de *E. coli*. (1) Marcador de peso molecular; (2) precipitado; (3) sobrenadante; (4) proteínas que não interagiram com a resina; (5) glutaredoxina.

4.1.4 Obtenção da fosfotirosina fosfatase (YopH) de *Yersinia enterocolitica*

A proteína YopH de *Yersinia enterocolitica* codificada pelo vetor p7-7Yop51* Δ 162 é uma proteína truncada que possui uma mutação pontual (C235R) e não possui os primeiros 162 aminoácidos. Estudos realizados por Zhang e seu grupo mostram que as propriedades cinéticas desta proteína truncada são semelhantes à forma *wild-type* desta enzima e apresenta vantagens como alta expressão e estabilidade (ZHANG et al., 1992).

A proteína expressa tem massa molecular teórica de 33,512 kDa e ponto isoelétrico de 8,99. A estrutura primária desta proteína é mostrada na figura 14.

```

Yop51* $\Delta$ 162
163 MRERPHTS GHGAGEARA
181 TAPSTVSPYG PEARAELSSR LFTLRNLTAP ATNDPRYLQA CGGEKLNRRF DIQRRQTAV
241 RADLNANYIQ VGNTRTIACQ YFLQSQLESH FRMLAENRTP VLAVLASSSE IANQRFGMPD
301 YFRQSGTYGS ITVESKMTQQ VGLGDGIMAD MYTLTIREAG QKTISVPEVVH VGNWPDQTAV
361 SSEVTKALAS LVDQTAETKR NMYESKSSA VADDSKLRPV IHCRAGYGRIT AQLIGAMCMN
421 DSRNSQLSVE DMVSMRVQR NGIMVQRDEQ LDVLIKLAEG QGRPLLNS
  
```

Figura 14. Estrutura primária da Yop51* Δ 162 com o sítio catalítico em destaque.

O perfil cromatográfico desta proteína (figura 15) mostra que a mesma foi eluída com 340 mM de NaCl. O SDS-PAGE realizado logo após a purificação (figura 16) mostra que as frações 22, 23, 24 e 25 correspondentes ao terceiro pico do perfil cromatográfico correspondem à proteína pura.

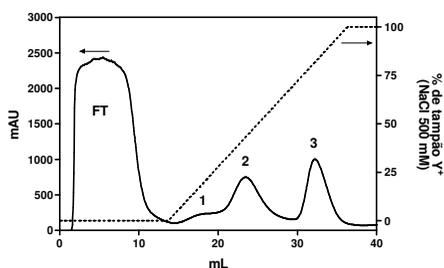


Figura 15. Perfil cromatográfico da YopH de *Yersinia enterocolitica*. Linha cheia: absorbância a 280 nm; linha pontilhada: concentração de Tampão Y⁺ (linha base correspondente à 100 mM de NaCl, patamar corresponde à 500 mM de NaCl); (FT) proteínas que não interagiram com a resina; (1) e (2) proteínas contaminante; (3) YopH.

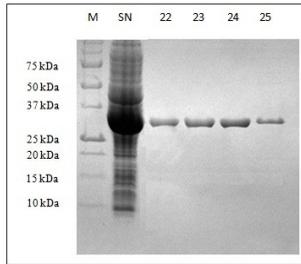


Figura 16. SDS-Page da purificação da fosfotirosina fosfatase YopH da *Yersinia enterocolitica*. (M) marcador de peso molecular, (SN) sobrenadante, (22), (23) (24 e 25) frações correspondentes à eluição da YopH.

4.2 Separação da fosfotirosina fosfatase putativa da protease TEV e da cauda de histidina

A PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* ao ser clivada pela protease TEV apresenta uma massa molecular teórica de 19,64 kDa.

A primeira metodologia que foi utilizada para tentar separar a protease TEV da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* foi a cromatografia de exclusão de peso molecular. Este método mostrou-se ineficiente pois, as proteínas TEV e PTP, apesar de possuírem massas diferentes, não puderam ser separadas adequadamente pela coluna Superdex 200 16/60.

A segunda metodologia testada para efetuar a separação das proteínas mostrou-se eficiente. A coluna HisTrap foi capaz de reter a protease TEV e a cauda de histidinas clivada, enquanto que a PTP era eluída (figura 17).

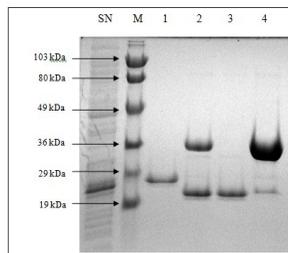


Figura 17. SDS-PAGE da separação da PTP de *Trypanosoma cruzi* da cauda de histidinas e da protease TEV. (SN) sobrenadante; (M) marcador de peso molecular, (1) PTP com cauda de histidinas; (2) produto da digestão da PTP com a protease TEV; (3) e (4) PTP clivada separada com coluna HisTrap e TEV, respectivamente.

4.3 Modelagem computacional da estrutura da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

A estrutura da PTP de *T. cruzi* foi modelada com a utilização do software I-Tasser (WU; SKOLNICK; ZHANG, 2007), que combina os métodos modelagem por alinhamento e por homologia de forma a encontrar a estrutura tridimensional mais provável para uma seqüência de proteínas. Os moldes encontrados pelo software foram as estruturas 1R6H, 1ZC1, 1OHE e 1RXD, correspondentes à PRL-3 humana, à Ufd1 de levedura, à Cdc14 humana e à PTP4A1 humana. À exceção da Ufd1, todas as proteínas em questão são fosfatases de especificidade duplas (DSPs), sendo a maior parte do modelo obtido a partir da PRL-3 humana, que apresenta 46% de identidade seqüencial em relação à PTP de *T. cruzi* e, portanto, deve apresentar estrutura tridimensional muito similar a ela.

A análise do alinhamento sequencial entre a PTP de *T. cruzi* e a PRL-3 humana (Figura 18) mostra que as regiões envolvidas em catálise estão altamente conservadas, o que indica uma boa reprodução da região do sítio ativo no modelo tridimensional produzido. As três regiões de importância para a catálise em DSPs são o P-loop, que contém o motivo característico CX₅R em todas as PTPs (resíduos 114-120), o aspártico catalítico Asp75 e o Q-loop, alça que contém um resíduo de glutamina (Q156) responsável por orientar uma molécula de água no sítio ativo para participação na reação. No caso dos dois primeiros motivos, a conservação é estrita inclusive nos resíduos flangeadores.

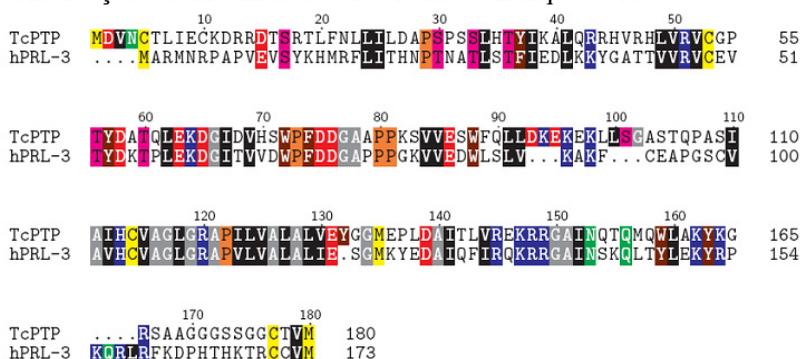


Figura 18. Alinhamento das sequências primárias das proteínas PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* e PRL-3 humana. Em destaque resíduos com as seguintes características: **X** ácido (-); **X** alifático; **X** alifático (pequeno); **X** amida; **X** aromático; **X** básico (+); **X** hidroxila; **X** imino; **X** enxofre.

As seqüências mais similares à da PTP de *T. cruzi* possuem resolvidas estruturas experimentais na conformação apo. Na ausência do substrato fosforilado, as alças envolvidas na catálise apresentam-se abertas, fechando-se na presença do substrato (o que promove a aproximação do aspartato catalítico ao P-loop). A disposição destes elementos pode ser visto na Figura 19.

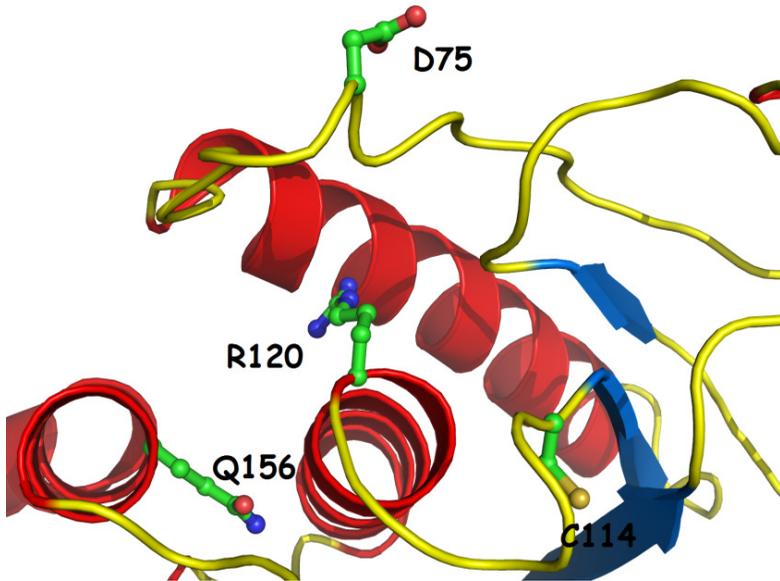


Figura 19. Disposição dos elementos cisteína 114 (C114), Arginina 120 (R-120), ácido aspártico 75 (D75) e glutamina 156 (Q156) no modelo estrutural da PTP de *Trypanosoma cruzi*.

4.4 Teste de atividade de fosfatase com a enzima PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

Dentre os tampões testados para a atividade de fosfatase da enzima o melhor resultado foi conseguido com o Tampão Hepes 50 mM, pH 8 a 37 °C. A atividade de fosfatase da PTP putativa no tampão Hepes 50 mM, pH 8 pode ser acompanhada na figura 20.

Atividade de fosfatase da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

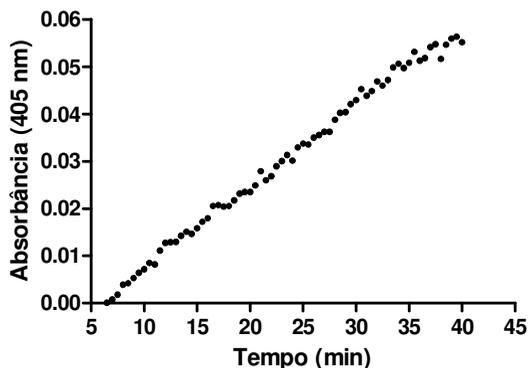


Figura 20. Gráfico da atividade de fosfatase da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* no Tampão Hepes 50 mM, pH 8 a 37 °C.

Apesar dos estudos estruturais mostrarem uma grande homologia com fosfatases de outros organismos, a PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* apresentou uma baixa atividade de fosfatase 0,15 nmol/min.mg nas condições testadas.

Um estudo publicado Kozlov e seu grupo com a PRL-3 humana mostra que a presença de uma alanina adjacente ao sítio catalítico (Ala111), ao invés de uma Serina/ Treonina (como ocorre em outras fosfatases), explica em parte a baixa atividade desta fosfatase. O grupamento hidroxila presente na serina e treonina conservada nas demais fosfatases é importante para a quebra do intermediário fosfoenzima e estabilização do grupamento tiol da cisteína catalítica. Kozlov e seu grupo mostraram que a mutação da alanina em questão para uma serina aumentou a eficiência de defosforilação da enzima. Além disso estes autores também sugerem que a posição distante do Asp 72 em relação ao sítio catalítico é outra causa da baixa atividade frente a substratos sintéticos e citam que a MKP-3 tem a sua atividade significativamente aumentada quando o substrato sintético é substituído por uma proteína substrato (KOZLOV et al., 2004). Um estudo publicado por Cuevas et al. mostrou a caracterização de uma PRL de *T. cruzi* a qual também apresentou uma baixa atividade de fosfatase que os autores atribuíram, citando o trabalho realizado por Kozlov et. al., em parte à presença da alanina adjacente ao sítio catalítico e a distância entre Asp 75 (da PRL de *T. cruzi*) e o sítio catalítico (CUEVAS et al., 2005).

No alinhamento mostrado na figura 18 pode-se notar que a PTP putativa de *T. cruzi* possui no seu sítio catalítico (aminoácidos 114 à 120) os mesmos aminoácidos também presentes no sítio catalítico da PRL-3 humana (aminoácidos 104 à 110) e adjacente aos dois sítios catalíticos há uma alanina (Ala121 no caso da PTP putativa de *T. cruzi* e Ala111 na PRL-3 humana). A presença desta alanina adjacente ao sítio catalítico, como demonstrado no estudo de Kozlov com a PRL-3 humana, poderia ser um dos motivos da PTP putativa de *T. cruzi* apresentar baixa atividade de fosfatase.

É possível também que a distância do Asp 75 em relação ao sítio catalítico também influencie na baixa atividade frente a substratos sintéticos como o pNPP assim como ocorre na PRL-3 (KOZLOV et al., 2004) e na PRL de *T. cruzi* (CUEVAS et al., 2005).

4.5 Teste de atividade de arsenato redutase com a enzima PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

Ao ser utilizado o sistema de oxi-redução contendo tiorredoxina, a PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* não foi capaz de reduzir o arsenato à arsenito, entretanto ao se utilizar o sistema de oxi-redução contendo glutathiona e glutaredoxina, a PTP putativa apresentou atividade de arsenato redutase.

A atividade específica da enzima foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do NADPH de $6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

A atividade de arsenato redutase da enzima pode ser acompanhada na figura 21, pelo decaimento da absorbância a 340 nm devido à oxidação do NADPH a NADP. Este gráfico mostra a atividade da enzima frente a três diferentes controles. O primeiro controle é feito na ausência tanto da PTP putativa quanto da glutaredoxina, o segundo controle é a presença da PTP putativa e ausência da glutaredoxina e o terceiro controle é feito na presença de glutaredoxina e ausência de PTP putativa. Pode-se concluir portanto, que a atividade de arsenato redutase da PTP putativa é dependente da presença da glutaredoxina.

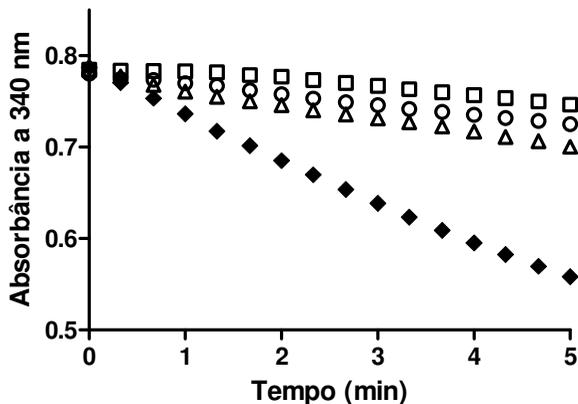
Atividade de arsenato redutase da PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

Figura 21. Gráfico da atividade de arsenato redutase da PTP putativa de *T. cruzi*. A atividade de arsenato redutase foi estimada pela oxidação do NADPH a 340 nm. (○) reação na ausência de glutaredoxina e da PTP putativa; (△) reação contendo 37 μM da PTP putativa e na ausência de glutaredoxina; (□) reação contendo 6,4 μM de glutaredoxina e na ausência da PTP putativa; (◆) reação contendo 37 μM da PTP putativa e 6,4 μM de glutaredoxina.

A atividade específica de arsenato redutase obtida para a PTP putativa de *T. cruzi* foi de 7 nmol/min.mg. Esta atividade é baixa quando comparada a atividade de arsenato redutases de organismos como *Synechocystis* sp. cepa PCC6803 (3,1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (LI; HAILE; KENNELLY, 2003), *E. coli* plasmídeo R773 (1,5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (GLADYSHEVA; ODEN; ROSEN, 1994) e *S. cerevisiae* (0,4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$) (MUKHOPADHYAY; SHI; ROSEN, 2000). Entretanto a atividade obtida neste estudo é próxima àquela encontrada para a arsenato redutase de *Leishmania major* (10 nmol/min.mg), protozoário pertencente a mesma família do *T. cruzi*, (ZHOU et al., 2004). Além de possuírem valores de atividade específica próximos, tanto a arsenato redutase de *Leishmania major* quanto de *T. cruzi* apresentam dependência da presença da enzima glutaredoxina para redução do arsenato a arsenito.

4.6 Triagem de inibidores da fosfotirosina fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica*

Foram testados 265 compostos como possíveis inibidores da proteína YopH de *Y. enterocolitica*. A partir de uma triagem inicial realizada, foi possível identificar 35 compostos que apresentaram uma capacidade inibitória da atividade enzimática superior a 30 % (Tabela 1). Destes 35 compostos, 25 são chalconas, 4 são sulfonilhidrazonas, 3 são oxidiazóis, 2 são sulfonamidas e 1 é hidrazida.

Tabela 1. Compostos que apresentaram porcentagem de inibição da atividade enzimática da YopH superior a 30%.

Inibidor	Porcentagem de inibição (%)	Inibidor	Porcentagem de inibição (%)
C3	39,71	R7	34,74
C12	34,24	R9	33,77
C26	30,51	R12	40,92
C29	32,41	R14	33,49
F20	75,76	R15	30,87
K4	42,33	R16	46,38
K6	63,21	R17	61,01
K13	94,76	R23	73,56
K14	93,28	R26	30,11
K15	82,25	R28	67,27
K19	51,22	R53	34,15
L5	35,52	R56	43,08
L6	39,34	R57	34,60
L11	36,68	R61	32,82
L46	31,86	Y07	74,07
L48	44,23	Z05	53,17
P4	63,19	Z07	51,96
P11	30,13		

4.7 Cálculos de IC₅₀

Ao realizar os ensaios de IC₅₀ com os 35 inibidores verificou-se que 4 destes apresentavam um valor de IC₅₀ menor que 50 µM (Tabela

2). Os demais compostos apresentaram IC_{50} superior a $50 \mu M$ e por este motivo, não foram escolhidos para a continuidade dos experimentos.

Tabela 2. Compostos que apresentaram valores de IC_{50} inferiores a $50 \mu M$

Inibidor	IC 50
L46	39,08 μM
P4	19,54 μM
P11	30,07 μM
R28	47,61 μM

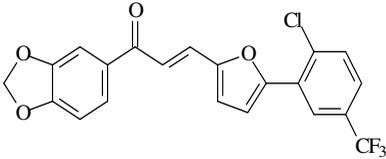
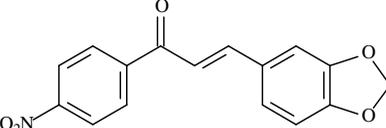
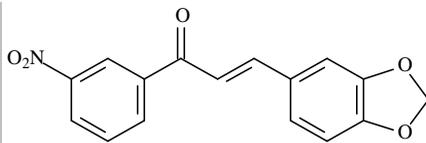
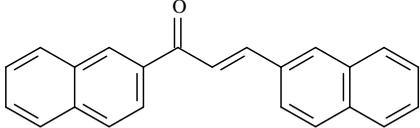
Como o artigo de Zhou et al mostra que a incubação da enzima com composto a ser testado previamente à adição do substrato influencia na inibição deste (ZHOU et al., 2010), fez-se então um teste de IC_{50} incubando cada um destes 4 compostos com a YopH por 10 minutos a $37^\circ C$. Em seguida foram calculados os valores de IC_{50} para estes. Os valores obtidos, com exceção do valor obtido para o composto L46, mostram que a incubação da enzima com o inibidor por 10 minutos à $37^\circ C$ realmente influencia nos resultados obtidos para IC_{50} (Tabela 3).

Tabela 3. Influência da incubação dos compostos P4, P11, L46 e R28 com a enzima por 10 minutos à $37^\circ C$ nos valores de IC_{50}

Inibidor	IC_{50} sem incubação com a enzima	IC_{50} com 10 minutos de incubação com a enzima
P4	19,54 μM	15,30 μM
P11	30,07 μM	9 μM
L46	39,08 μM	38 μM
R28	47,61 μM	19,30 μM

Fez-se então, 3 testes consecutivos em triplicata para calcular a média e o desvio padrão corretos para a IC_{50} dos 4 compostos. Ressalta-se que nestes testes foi feita a incubação de cada composto com a YopH por 10 minutos a $37^\circ C$. Posteriormente, acrescentou-se o substrato p-NPP para verificar a atividade residual da enzima (Tabela 4).

Tabela 4. Valores de IC₅₀ com desvio padrão obtidos para os inibidores P4, P11, L46 e R28. Experimento com incubação inicial de cada composto com a YopH por 10 minutos.

Inibidor	Estrutura química	IC 50 ± desvio padrão
L46		38,55 ± 0,6 μM
P4		15,08 ± 1,12 μM
P11		9,92 ± 2,19 μM
R28		20,29 ± 1,11 μM

Analisando a estrutura química dos 4 compostos mais ativos (Tabela 4), observa-se que as estruturas dos mesmos diferem entre si, exceto P4 e P11 que possuem o mesmo anel base e diferem apenas pela posição do grupo nitro. Dessa forma, apesar da quantidade de compostos avaliados neste estudo (265), não é possível estabelecer uma relação estrutura-atividade dos compostos identificados como inibidores da proteína YopH.

Um artigo publicado por Liang et. al. em 1997 comenta que o sítio ativo das PTP possui uma considerável plasticidade tal que compostos substituídos e poliaromáticos significativamente grandes podem ser acomodados para ganhar interações hidrofóbicas adicionais, o que não ocorre para compostos com um único anel aromático (LIANG et al., 2003). Esta observação pode explicar a acomodação do composto R28 (poliaromático) no sítio catalítico. Quanto aos demais compostos

(P4, P11, L46) esta observação não se aplicaria pois estes possuem apenas dois anéis aromáticos.

4.8 Cinética enzimática

Nos testes cinéticos foram utilizadas duas concentrações pré determinadas para cada um dos quatro inibidores. Estas concentrações correspondem a aproximadamente um terço e metade da concentração encontrada no IC_{50} para cada composto. Os valores de K_m aparente obtidos e de K_i para cada composto encontram-se na tabela 5.

Para o composto L46 foram utilizadas as concentrações de 12 e 24 μM . O gráfico gerado a partir do estudo cinético com este composto mostra uma inibição do tipo competitiva (Figura 22).

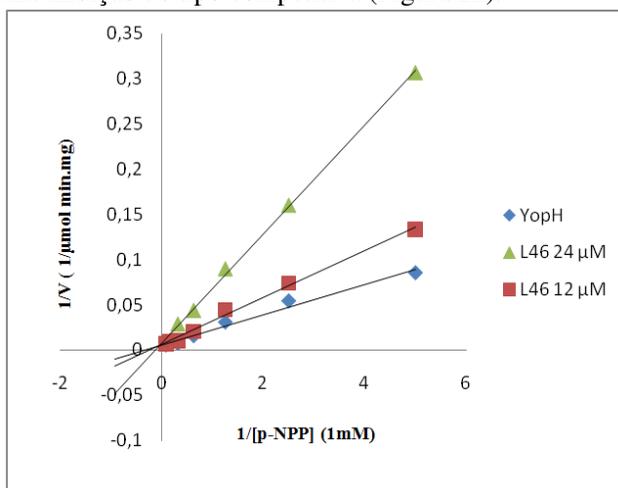


Figura 22. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona L46. O gráfico duplo-recíproco de Lineweaver- Burk mostra uma inibição do tipo competitiva.

Para o composto P4 foram utilizadas as concentrações de 5 e 10 μM . O gráfico gerado a partir do estudo cinético com este composto mostra uma inibição do tipo competitiva (Figura 23).

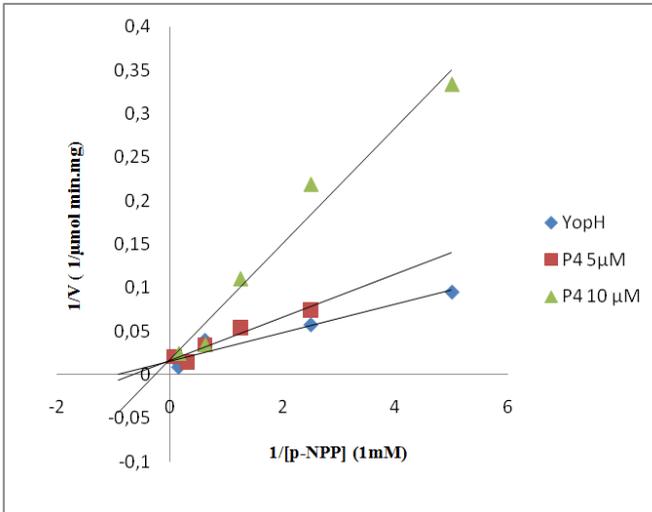


Figura 23. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona P4. O gráfico duplo-recíproco de Lineweaver- Burk mostra uma inibição do tipo competitiva.

Para o composto P11 foram utilizadas as concentrações de 3 e 6 μM . O gráfico gerado a partir do estudo cinético com este composto mostra uma inibição do tipo competitiva (Figura 24).

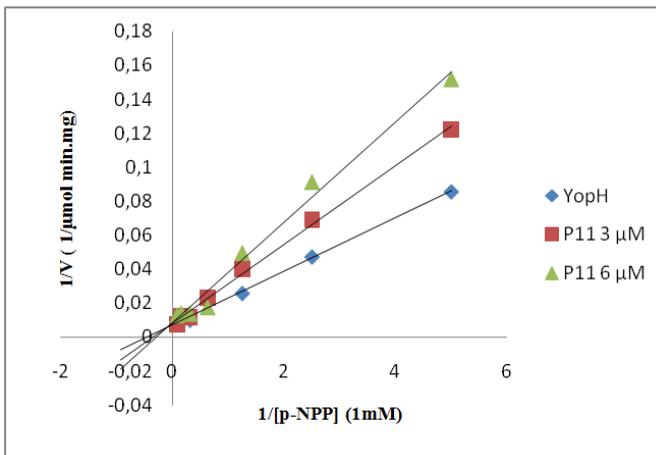


Figura 24. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona P11. O gráfico duplo-recíproco de Lineweaver- Burk mostra uma inibição do tipo competitiva.

Para o composto R28 foram utilizadas as concentrações de 10 e 20 μM . O gráfico gerado a partir do estudo cinético com este composto mostra uma inibição do tipo competitiva (Figura 25).

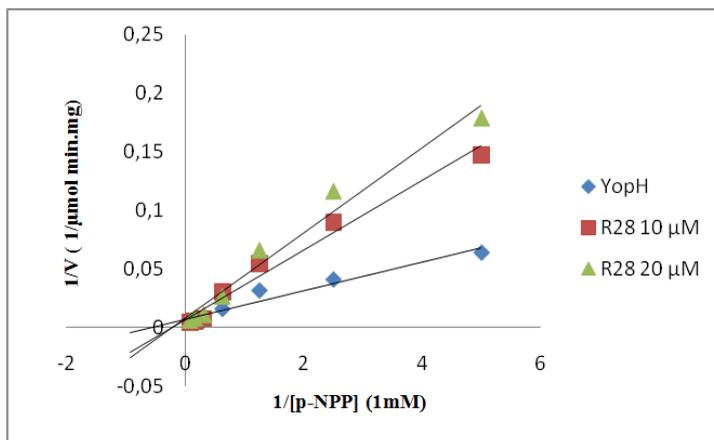


Figura 25. Estudo cinético da inibição da YopH pela chalcona R28. O gráfico duplo-recíproco de Lineweaver- Burk mostra uma inibição do tipo competitiva.

Analisando os gráficos apresentados nas figuras 22, 23, 24 e 25, fica evidente que as chalconas L46, P4, P11 e R28 apresentam mecanismo de inibição competitivo, porque:

- a inclinação das retas com o inibidor muda em relação à reta sem inibidor, onde $\alpha = K_M / V_{\text{max}}$;

- a intersecção em x muda, onde a interceptação do eixo $x = -1 / K_{M\text{app}}$. O K_M aumenta com o aumento da concentração de composto; desta forma, mais pNPP é necessário para a reação chegar a uma determinada velocidade na presença das chalconas do que em sua ausência.

- a intersecção em y não muda, onde a interceptação do eixo $y = 1 / V_{\text{max}}$. Assim, a V_{max} permanece inalterada.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos experimentais da YopH para o substrato pNPP e as chalconas L46, P4, P11 e R28. V_{max} = velocidade máxima; K_{Mapp} = constante de Michaelis-Menten; K_i = constante de dissociação do complexo enzima-inibidor.

Inibidor	[I] (μM)	V_{max} (μmol pNP/min.mg)	K_{Mapp} (mM)	$K_i \pm$ desvio padrão (μM)
L46	0	0,006	1,46	11,01 \pm
	12		2,21	1,56
	24		4,41	
P4	0	0,016	1,89	3,13 \pm 0,5
	5		4,31	
	10		7,97	
P11	0	0,008	1,27	2,41 \pm 1,67
	3		2,19	
	6		3,33	
R28	0	0,006	1,81	14,93 \pm
	10		4,29	0,38
	20		4,67	

K_{Mapp} e V_{max} foram obtidas do gráfico duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, enquanto K_i foi determinada pelo *replot* do gráfico de Lineweaver-Burk: $K_{Mapp} \times [I]$.

Ainda, é importante ressaltar que os valores obtidos para K_i são menores que os valores de K_{Mapp} , indicando que a YopH parece ter maior afinidade pelos inibidores que pelo substrato pNPP.

5.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto à PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

A PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* apresenta 46% de identidade seqüencial em relação à fosfatase de dupla especificidade PRL-3 humana. Apesar da semelhança com as fosfatases de dupla especificidade, a PTP em ensaios *in vitro* apresentou uma baixa capacidade de hidrolisar o substrato p-nitrofenolfosfato (0,15 nmol/min.mg). Tendo em vista a capacidade de certas enzimas como a LmACR2 de *Leishmania major* e a ArsC de *Staphylococcus aureus* de defosforilar o substrato p-nitrofenolato e de reduzir o arsenato [As(V)] à arsenito [As(III)], cogitou-se que a PTP putativa poderia ser uma arsenato redutase. Esta enzima foi então testada em um sistema de oxidação-redução na presença de glutaredoxina. Surpreendentemente a PTP putativa apresentou atividade de arsenato redutase (7 nmol/min.mg). Este é o primeiro estudo que demonstra tal propriedade de uma enzima de *Trypanosoma cruzi*. Espera-se que esta descoberta possa contribuir para melhor compreensão do papel desta enzima nas vias metabólicas do *T. cruzi* e assim futuramente auxiliar na busca de fármacos para a doença de Chagas.

Quanto a triagem de inibidores da YopH

A triagem realizada com os 265 compostos resultou na descoberta de quatro inibidores da YopH os quais apresentaram valores de IC_{50} inferiores a 50 μM . A inibição da fosfatase YopH por estes inibidores é do tipo competitiva, fato que pode ser comprovado pela constância da velocidade máxima (na ausência e na presença do inibidor), e pela variação no valor do K_m gerando os chamados K_m aparentes.

Os quatro inibidores L46, P4, P11 e R28 apresentaram valores de K_i de 11,01 μM , 3,13 μM , 2,41 μM e 14,93 μM respectivamente.

Espera-se que com a descoberta destes quatro inibidores, seja possível desenhar novas estruturas químicas baseada na estrutura destes a fim de obter novos compostos com capacidade inibitória superiores.

6.0 PERSPECTIVAS

Quanto a PTP putativa de *Trypanosoma cruzi*

Para a PTP putativa de *Trypanosoma cruzi* tem-se como perspectivas:

- realizar estudos cinéticos tanto para a atividade de fosfatase quanto de arsenato redutase;
- obter a proteína contendo átomos marcados para resolver sua estrutura por ressonância magnética nuclear (RMN);
- verificar se a atividade de fosfatase e de arsenato redutase é influenciada pela S-nitrosilação da enzima;
- realizar mutação sítio-dirigida na cisteína catalítica (C114) e verificar se a proteína perde a capacidade catalítica.
- realizar mutação sítio-dirigida na alanina (A121) adjacente ao sítio catalítico para uma serina ou treonina a fim de verificar se há um aumento na eficiência de defosforilação da enzima.

Quanto a tirosina fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica*

Para a tirosina fosfatase YopH de *Yersinia enterocolitica* tem-se como perspectivas:

- fazer triagem com novos compostos com o objetivo de conseguir mais inibidores;
- realizar estudos sobre a influência da S-nitrosilação sobre a atividade desta enzima.
- prever a interação dos inibidores no sítio ativo da YopH através de modelagem molecular.

REFERÊNCIAS

ALONSO, A. et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, 2004.

ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. Opinion: The Trypanosoma cruzi - Host-cell interplay: Location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819-823, 2005.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. 3rd, John Wiley & Sons. 1995.

BACH, H. et al. Mycobacterium tuberculosis Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 5, p. 316-322, 2008.

BACOT, A. W.; MARTIN, C. J. LXVII. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. **The Journal of Hygiene**, n. 13 (Suppl), p. 423-439, 1914.

BARFORD, D.; DAS, A. K.; EGLOFF, M. P. The structure and mechanism of protein phosphatases: Insights into catalysis and regulation. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 27, p. 133-164, 1998.

BARFORD, D.; JIA, Z.; TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases take off. **Nature Structural Biology**, v. 2, n. 12, p. 1043-1053, 1995.

BENNETT, M. S. et al. *Bacillus subtilis* arsenate reductase is structurally and functionally similar to low molecular weight protein tyrosine phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13577-13582, 2001.

BHATTACHARJEE, H. et al. Adventitious arsenate reductase activity of the catalytic domain of the human Cdc25B and Cdc25C phosphatases. **Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 802-809, 2010.

BLEVES, S.; CORNELIS, G. R. How to survive in the host: The Yersinia lesson. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1451-1460, 2000.

BOTTONE, E. J. Yersinia enterocolitica: Overview and epidemiologic correlates. **Microbes and Infection**, v. 1, n. 4, p. 323-333, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Brasil receberá certificado internacional da interrupção da transmissão vetorial da Doença de Chagas pelo Triatoma Infestans. . Ministério da Saúde. Notícia. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nota_chagas0206.pdf, 2006.

BRASIL. Glossário doenças de A a Z: “Doença de Chagas”. Aspectos epidemiológicos. . Ministério da Saúde. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454, 2010.

BURKE JR, T. R.; ZHANG, Z. Y. Protein-tyrosine phosphatases: Structure, mechanism, and inhibitor discovery. **Biopolymers**, v. 47, n. 3, p. 225-241, 1998.

CARRINGTON, J. C.; DOUGHERTY, W. G. A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco

etch virus polyprotein processing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 10, p. 3391-3395, 1988.

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v. 465, n. 7301 SUPPL., 2010.

COHEN, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation - A 25 year update. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 12, p. 596-601, 2000.

COOK, W. S.; UNGER, R. H. Protein tyrosine phosphatase 1B: A potential leptin resistance factor of obesity. **Developmental Cell**, v. 2, n. 4, p. 385-387, 2002.

COURA, J. R. Chagas disease: What is known and what is needed - A background article. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. SUPPL. 1, p. 113-122, 2007.

CUEVAS, I. C. et al. Characterization of farnesylated protein tyrosine phosphatase TcPRL-1 from *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 9, p. 1550-1561, 2005.

DE LA PUERTA, M. L. et al. Characterization of new substrates targeted by *Yersinia* tyrosine phosphatase YopH. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, 2009.

DE SOUZA, W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: Dreams and reality. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, 2002.

EL-SAYED, N. M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, 2005.

FIGUEIREDO DA SILVA, A. A. et al. Crystal structure of chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Structural Biology**, v. 157, n. 2, p. 416-423, 2007.

GALVÃO, C. Sistemática e taxonomia clássica. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=21>, 2010.

GLADYSHEVA, T. B.; ODEN, K. L.; ROSEN, B. P. Properties of the arsenate reductase of plasmid R773. **Biochemistry**, v. 33, n. 23, p. 7288-7293, 1994.

HIGUCHI, M. L. Cardiopatia Chagásica Humana - Aspectos Anátomopatológicos e Patogenia. FIOCRUZ. Portal de Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=26>, 2010.

HUNTER, T. Signaling - 2000 and beyond. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 113-127, 2000.

JI, G. et al. Arsenate reductase of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. **Biochemistry**, v. 33, n. 23, p. 7294-7299, 1994.

KOUL, A. et al. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 189-202, 2004.

KOZLOV, G. et al. Structural Insights into Molecular Function of the Metastasis-associated Phosphatase PRL-3. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 12, p. 11882-11889, 2004.

KROPF, S. P. História da doença de Chagas: ciência, saúde e sociedade. FIOCRUZ. Portal de Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=171>., 2010.

LI, R.; HAILE, J. D.; KENNELLY, P. J. An Arsenate Reductase from *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803 Exhibits a Novel Combination of Catalytic Characteristics. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 23, p. 6780-6789, 2003.

LIANG, F. et al. Aurintricarboxylic Acid Blocks in Vitro and in Vivo Activity of YopH, an Essential Virulent Factor of *Yersinia pestis*, the Agent of Plague. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41734-41741, 2003.

LIU, S. et al. Targeting inactive enzyme conformation: Aryl diketoacid derivatives as a new class of PTP1B inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 50, p. 17075-17084, 2008.

MARCILLA, A. et al. Nuclear rDNA ITS-2 sequences reveal polyphyly of *Panstrongylus* species (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), vectors of *Trypanosoma cruzi*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 1, n. 3, p. 225-235, 2002.

MASCARELLO, A. et al. Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* tyrosine phosphatase PtpA by synthetic chalcones: Kinetics, molecular modeling, toxicity and effect on growth. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 3783-3789, 2010.

MESSENS, J. et al. The essential catalytic redox couple in arsenate reductase from *Staphylococcus aureus*. **Biochemistry**, v. 38, n. 51, p. 16857-16865, 1999.

MUKHOPADHYAY, R. et al. Structural Characterization of the As/Sb Reductase LmACR2 from *Leishmania major*. **Journal of Molecular Biology**, v. 386, n. 5, p. 1229-1239, 2009.

MUKHOPADHYAY, R.; SHI, J.; ROSEN, B. P. Purification and characterization of Acr2p, the *Saccharomyces cerevisiae* arsenate reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 28, p. 21149-21157, 2000.

ORR, G. A. et al. Identification of novel serine/threonine protein phosphatases in *Trypanosoma cruzi*: A potential role in control of cytokinesis and morphology. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1350-1358, 2000.

PULIDO, R.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H. Protein tyrosine phosphatases: Dual-specificity phosphatases in health and disease. **FEBS Journal**, v. 275, n. 5, p. 848-866, 2008.

RAJALA, R. V. S. et al. Diabetes reduces autophosphorylation of retinal insulin receptor and increases protein-tyrosine phosphatase-1B activity. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 50, n. 3, p. 1033-1040, 2009.

RAUGEI, G.; RAMPONI, G.; CHIARUGI, P. Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: Small, but smart. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 6, p. 941-949, 2002.

REZENDE, J. M. A forma digestiva da doença de Chagas - resenha histórica. FIOCRUZ. Portal de Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=26>, 2010.

ROSEN, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. **FEBS Letters**, v. 529, n. 1, p. 86-92, 2002.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 14-21, 2010.

SEBBANE, F. et al. Role of the Yersinia pestis plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 14, p. 5526-5530, 2006.

SMILEY, S. T. Immune defense against pneumonic plague. **Immunological Reviews**, v. 225, n. 1, p. 256-271, 2008.

SOUZA, W. Métodos morfológicos. FIOCRUZ. Portal de Doença de Chagas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=12>, 2010.

STOLZ, J. F.; BASU, P.; OREMLAND, R. S. Microbial transformation of elements: The case of arsenic and selenium. **International Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 201-207, 2002.

TABERNEIRO, L. et al. Protein tyrosine phosphatases: Structure-function relationships. **FEBS Journal**, v. 275, n. 5, p. 867-882, 2008.

TARLETON, R. L. et al. The challenges of Chagas disease - Grim outlook or glimmer of hope? **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1852-1857, 2007.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 974, p. 788-798, 2006.

TRABULSI, L. R.; MARTINEZ, M. B. **Microbiologia**. ed. 4, São Paulo: Editora Atheneu. p. 329-335. 2005.

VIBOUD, G. I.; BLISKA, J. B. Yersinia Outer Proteins: Role in Modulation of Host Cell Signaling Responses and Pathogenesis. **Annual Review of microbiology**, v. 59 p. 69-89, 2005.

WREN, B. W. The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. **Nature reviews. Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 55-64, 2003.

WU, S.; SKOLNICK, J.; ZHANG, Y. Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations. **BMC Biology**, v. 5, 2007.

ZEGERS, I. et al. Arsenate reductase from *S. aureus* plasmid pI258 is a phosphatase drafted for redox duty. **Nature Structural Biology**, v. 8, n. 10, p. 843-847, 2001.

ZHANG, Z. Y. Protein tyrosine phosphatases: Prospects for therapeutics. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 416-423, 2001.

ZHANG, Z. Y. Protein Tyrosine Phosphatases: Structure and Function, Substrate Specificity, and Inhibitor Development. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 209-234, 2002.

ZHANG, Z. Y. et al. Expression, purification, and physicochemical characterization of a recombinant Yersinia protein tyrosine phosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 33, p. 23759-23766, 1992.

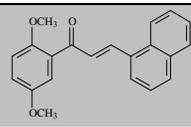
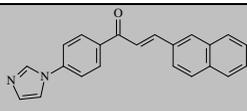
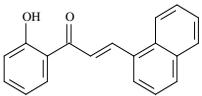
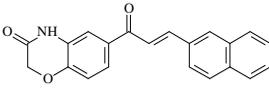
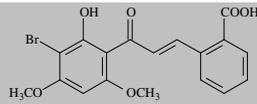
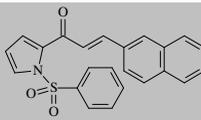
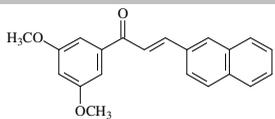
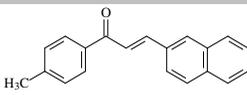
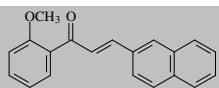
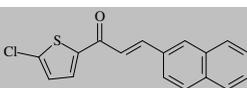
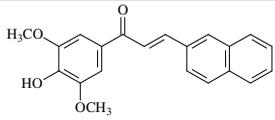
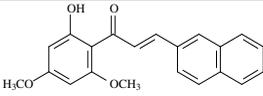
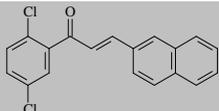
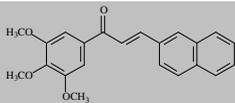
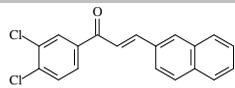
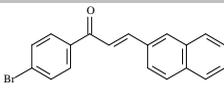
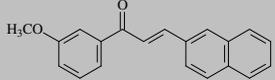
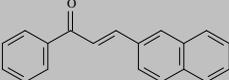
ZHOU, B. et al. Targeting mycobacterium protein tyrosine phosphatase B for antituberculosis agents. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 10, p. 4573-4578, 2010.

ZHOU, Y.; BHATTACHARJEE, H.; MUKHOPADHYAY, R.
Bifunctional role of the leishmanial antimonate reductase LmACR2 as a
protein tyrosine phosphatase. **Molecular and Biochemical
Parasitology**, v. 148, n. 2, p. 161-168, 2006.

ZHOU, Y. et al. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony
reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. **Journal of
Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37445-37451, 2004.

APÊNDICE A - Compostos sintéticos testados na YopH

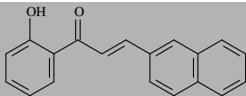
Tabela 1. Chalconas testadas na triagem de inibidores para a enzima YopH de *Yersinia enterocolitica*.

Inibidor	Estrutura	Inibidor	Estrutura
A1		C7	
A16		C9	
B81		C10	
C1		C11	
C2		C12	
C3		C13	
C4		C24	
C5		C25	
C6		C26	

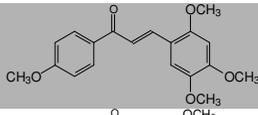
Continua...

Continua...

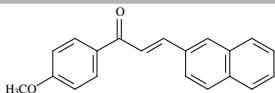
C27



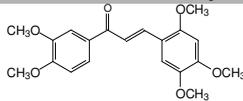
D4



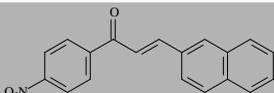
C28



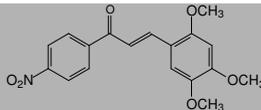
D05



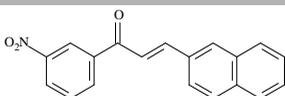
C29



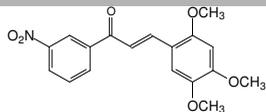
D06



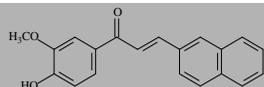
C30



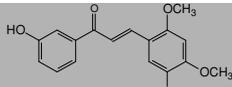
D07



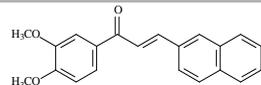
C31



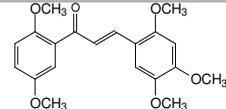
D08



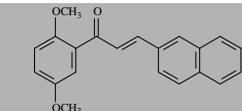
C33



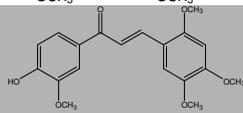
D09



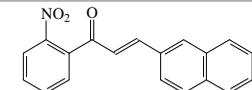
C37



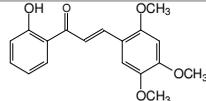
D10



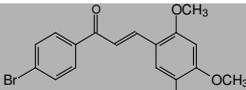
C38



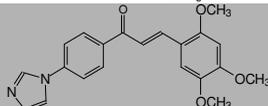
D12



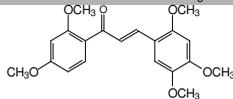
D01



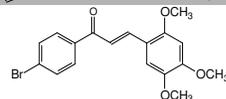
D13



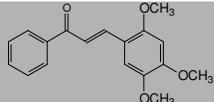
D02



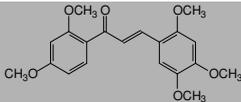
D14



D3



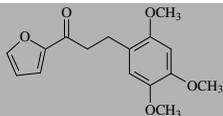
D15



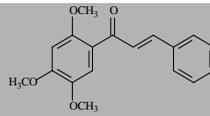
Continua...

Continua...

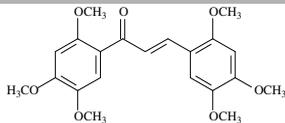
D17



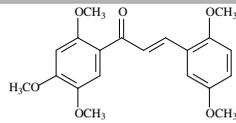
J14



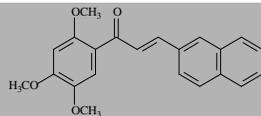
J01



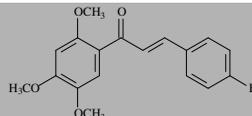
J17



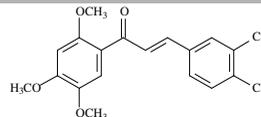
J04



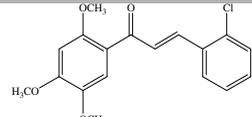
J18



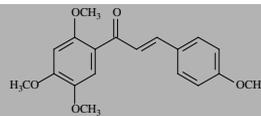
J06



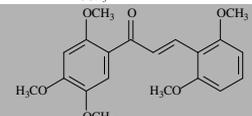
J19



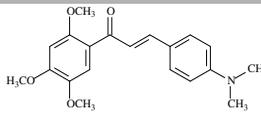
J07



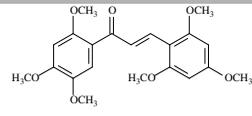
J20



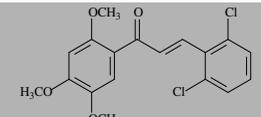
J08



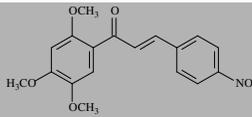
J21



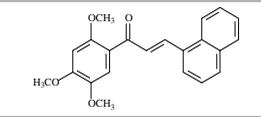
J09



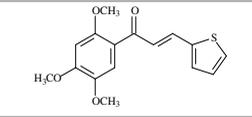
J22



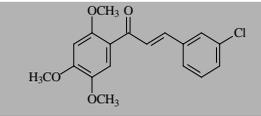
J11



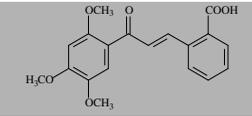
J23



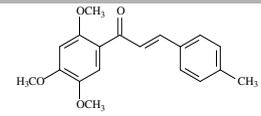
J12



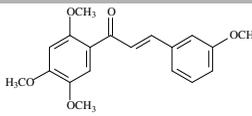
J24



J13



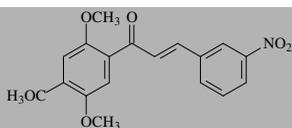
J25



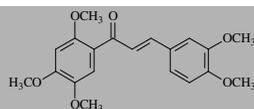
Continua...

Continua...

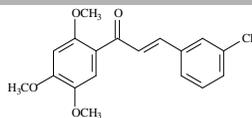
J27



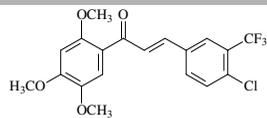
J52



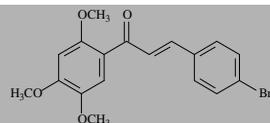
J28



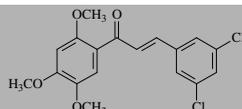
J54



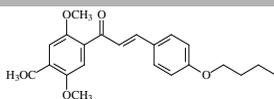
J29



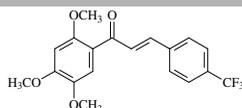
J55



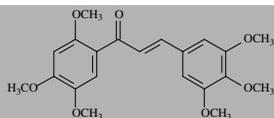
J30



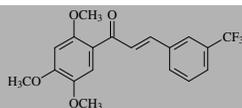
J56



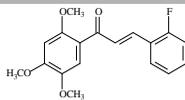
J31



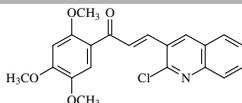
J57



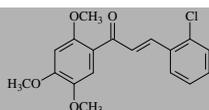
J33



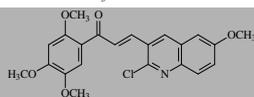
J61



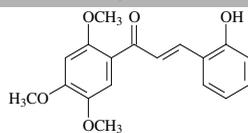
J34



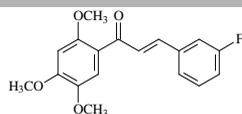
J62



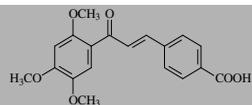
J35



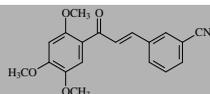
J63



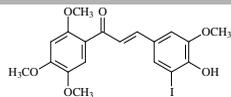
J42



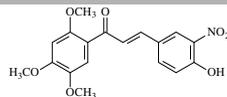
J65



J46

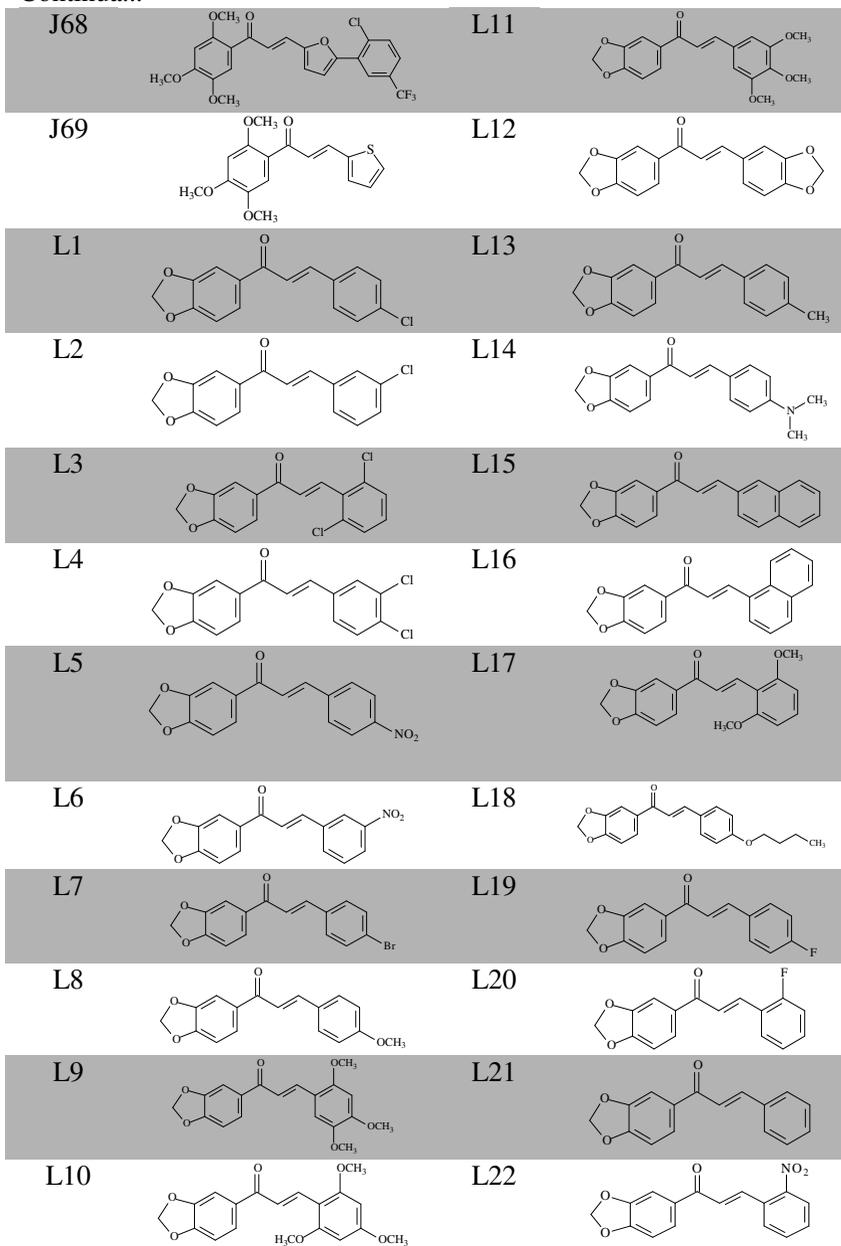


J66



Continua...

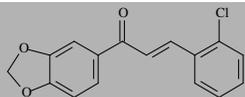
Continua...



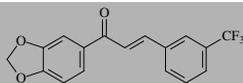
Continua...

Continua...

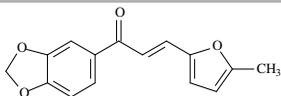
L23



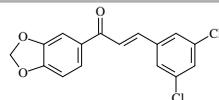
L42



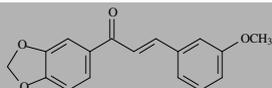
L24



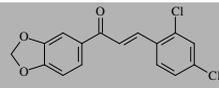
L43



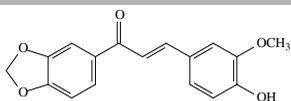
L25



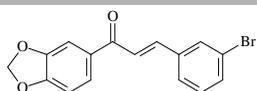
L44



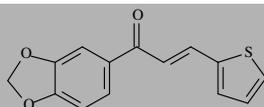
L26



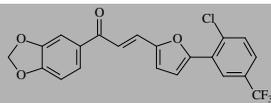
L45



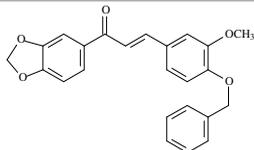
L27



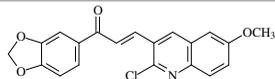
L46



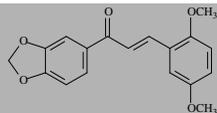
L28



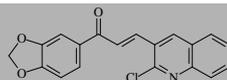
L47



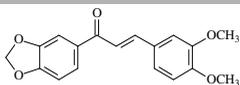
L29



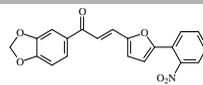
L48



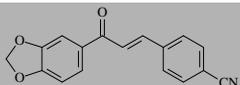
L38



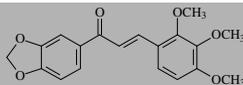
L50



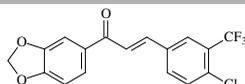
L39



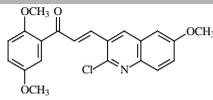
L51



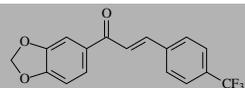
L40



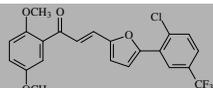
Lou 2



L41



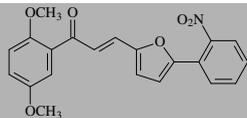
Lou 3



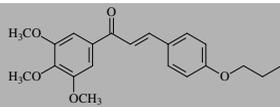
Continua...

Continua...

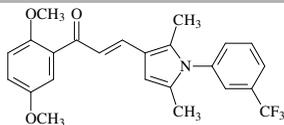
Lou 4



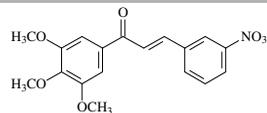
M13



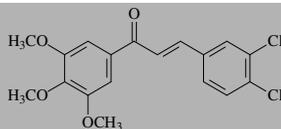
Lou 5



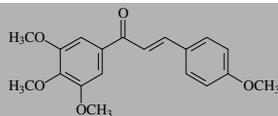
M15



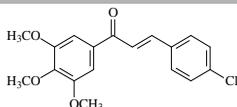
M5



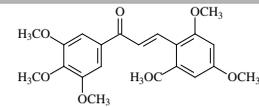
M16



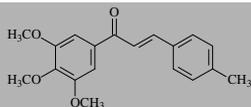
M6



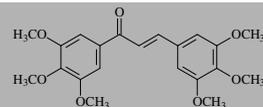
M18



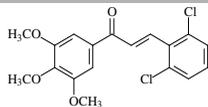
M7



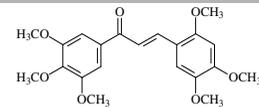
M20



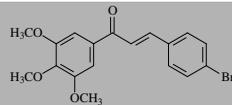
M8



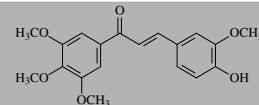
M24



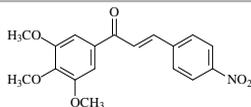
M9



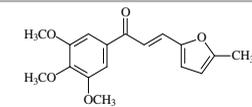
M25



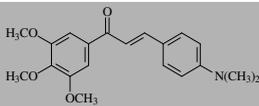
M10



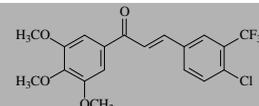
M26



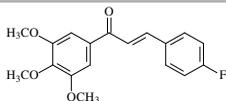
M11



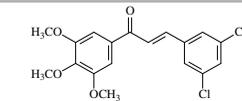
M30



M12



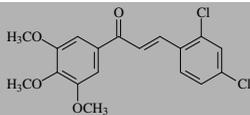
M32



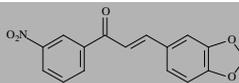
Continua...

Continua...

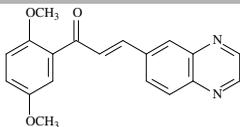
M33



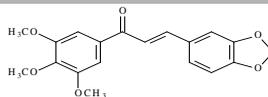
P11



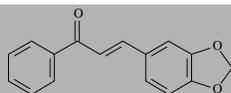
N9



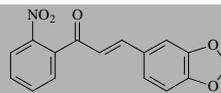
P12



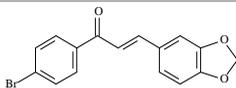
P1



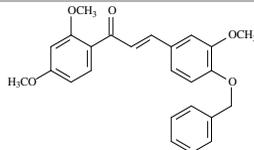
P13



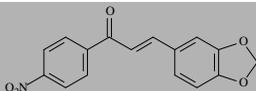
P3



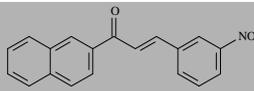
R6



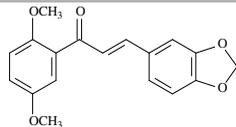
P4



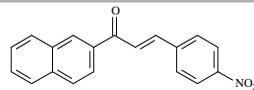
R7



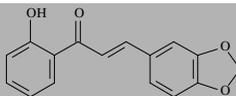
P5



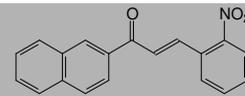
R8



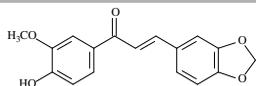
P6



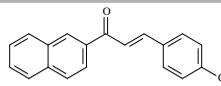
R9



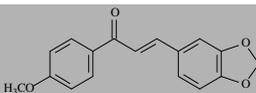
P7



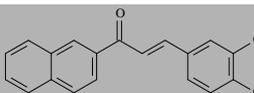
R10



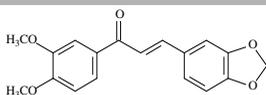
P8



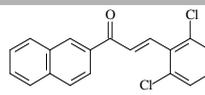
R11



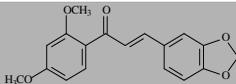
P9



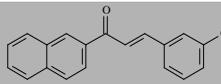
R12



P10



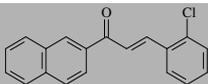
R13



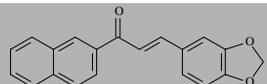
Continua...

Continua...

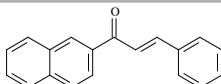
R14



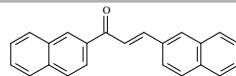
R27



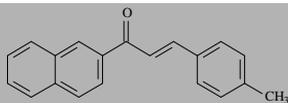
R15



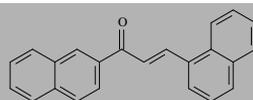
R28



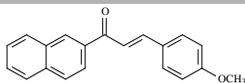
R16



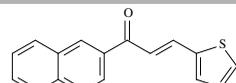
R29



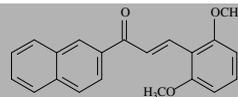
R17



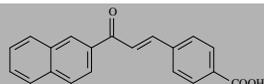
R30



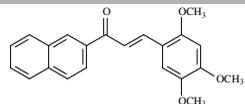
R19



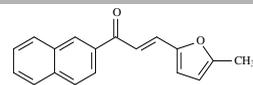
R32



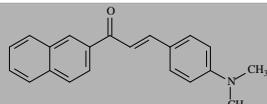
R20



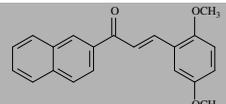
R36



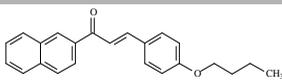
R21



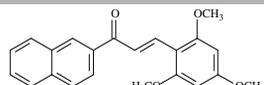
R42



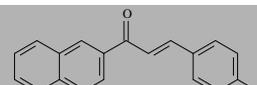
R23



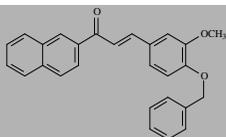
R44



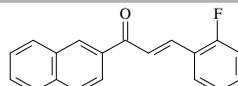
R24



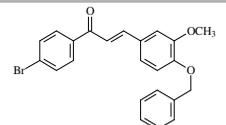
R45



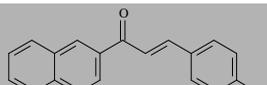
R25



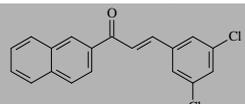
R46



R26



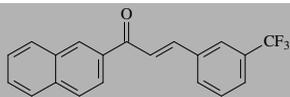
R48



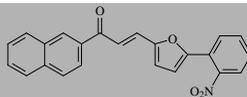
Continua...

Continua...

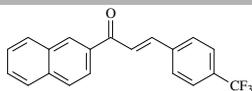
R49



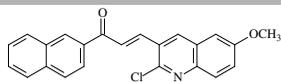
R56



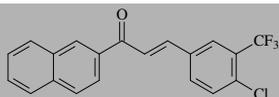
R50



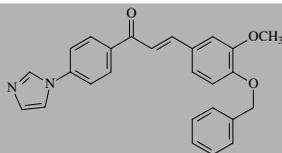
R57



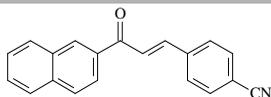
R51



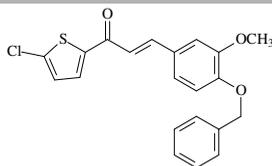
R58



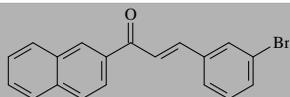
R52



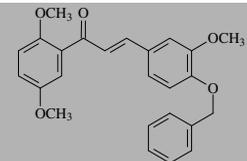
R61



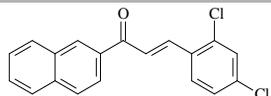
R53



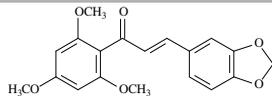
R62



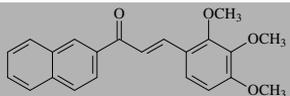
R54



T43



R55



T46

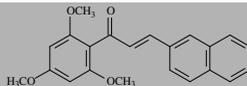


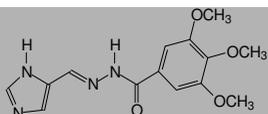
Tabela 2. Hidrazidas testadas na triagem de inibidores para a enzima YopH de *Yersinia enterocolitica*.

Inibidor	Estrutura	Inibidor	Estrutura
F1		F10	
F2		F11	
F3		F12	
F4		F13	
F5		F14	
F6		F16	
F7		F17	
F8		F18	
F9		F19	

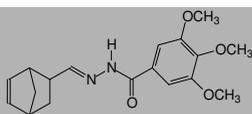
Continua...

Continua...

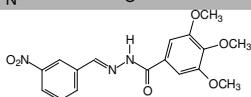
F20



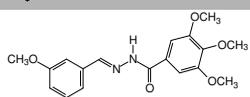
F38



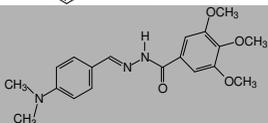
F21



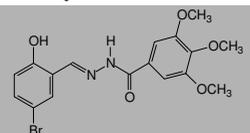
F39



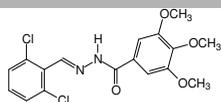
F23



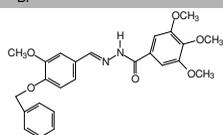
F41



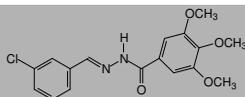
F24



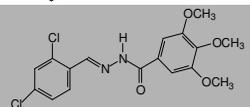
F42



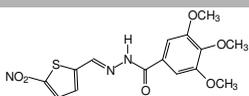
F25



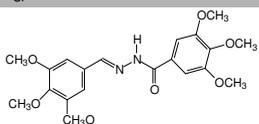
F43



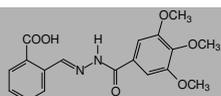
F29



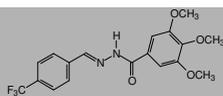
F44



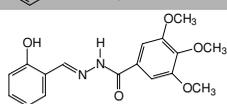
F30



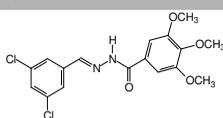
F46



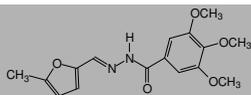
F31



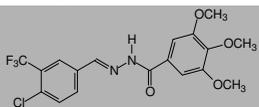
F47



F32



F48



F35

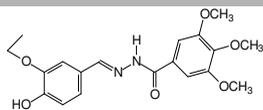


Tabela 3. Oxadiazóis testados na triagem de inibidores para a enzima YopH de *Yersinia enterocolitica*.

Inibidor	Estrutura	Inibidor	Estrutura
Y01		Z5	
Y07		Z7	
Y13		Z8	
Y17		Z43	
Y18		Z47	

Tabela 4. Sulfonilhidrazonas testadas na triagem de inibidores para a enzima YopH de *Yersinia enterocolitica*.

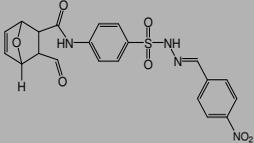
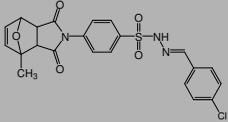
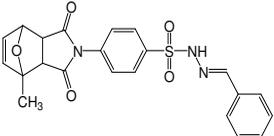
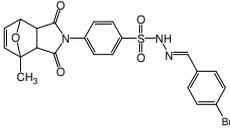
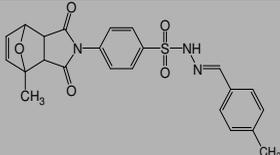
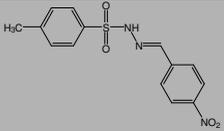
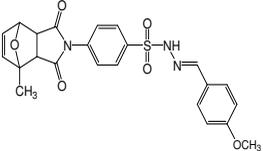
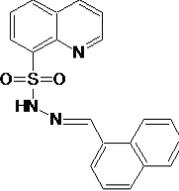
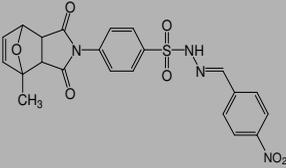
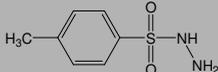
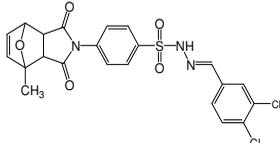
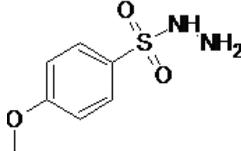
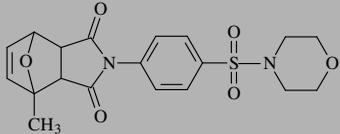
Inibidor	Estrutura	Inibidor	Estrutura
K11		K25	
K13		K87	
K14		K140	
K15		1-naftil 8Q	
K16		SH140	
K19		p-OCH ₃ - 8H	

Tabela 5. Sulfonamidas testadas na triagem de inibidores para a enzima YopH de *Yersinia enterocolitica*.

Inibidor	Estrutura
K4	
K6	