



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

ANA KARLA MIRANDA PRADO

**Caracterização biofísica da interação entre o flavonoide Morina e a
proteína Transaldolase isolada de *Corynebacterium
pseudotuberculosis***

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP
2017

Ana Karla Miranda Prado

**Caracterização biofísica da interação entre o flavonoide Morina e a
proteína Transaldolase isolada de *Corynebacterium
pseudotuberculosis***

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Biofísica Molecular junto ao Programa de Pós-graduação em Biofísica Molecular do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Fátima Pereira de Souza
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO – SP
2017

Prado, Ana Karla Miranda.

Caracterização biofísica da interação entre o flavonoide Morina e a proteína Transaldolase isolada de *Corynebacterium pseudotuberculosis* / Ana Karla Miranda Prado. -- São José do Rio Preto, 2017

84 f. : il., tabs.

Orientador: Fátima Pereira de Souza

Coorientador: Marcelo Andrés Fossey

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Biofísica. 3. Proteínas – Estrutura. 4. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. 5. Flavonoides. 6. Transaldolase. 7. Espectrometria de fluorescência. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 577.112

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ana Karla Miranda Prado

Caracterização biofísica da interação entre o flavonoide Morina e a
proteína Transaldolase isolada de *Corynebacterium*
pseudotuberculosis

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biofísica, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biofísica Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Fátima Pereira de Souza
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Tatiana Elias Colombo
FAMERP

Prof.Dr. José Ramon Beltran Abrego
UNESP – São José do Rio Preto

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

2017

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me apoiaram e auxiliaram na realização dos meus estudos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Fátima Pereira de Souza, pela amizade durante os bons e maus momentos e pela preocupação com minha formação e meu futuro, pela valiosa orientação e atenção dedicada, incentivo, conselhos proporcionados ao longo da minha caminhada, crescimento profissional e científico que me proporcionou. Admiro seu desempenho e dedicação a tudo.

Ao Prof. Dr. Marcelo Andrés Fossey, pela dedicada co-orientação empregada na realização deste projeto, sempre disposto a ensinar.

Agradeço ao Prof. Dr. Fernando Alves de Melo pelos ensinamentos e atenção dedicada sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Altair do Departamento de Química, por ter cedido o aparelho de espectrofotometria de fluorescência para a realização dos experimentos. Processo Fapesp 2014/17511-0.

Ao Prof. Dr. Luis Octávio por fornecer o flavonoide utilizado neste projeto.

Aos amigos de laboratório, pelas amizades e ajudas proporcionadas ao longo desses anos.

Ao Dr. Ícaro P. Caruso e Dr. Ricardo Mariutti, pelo auxílio nos experimentos e correção do manuscrito.

Agradeço ao Paulo da Silva, pela amizade, conselhos, por não medir esforços quando precisei de ajuda e por me fazer acreditar que eu era capaz.

Aos funcionários do Departamento de Física pela atenção e eficiência no atendimento.

Aos meus pais os quais amo muito, pela estrutura, carinho, paciência e incentivo para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Aos meus avós, Inês e Antônio que nunca mediram esforços em proporcionar todo o suporte necessário para mais essa conquista em minha vida. Agradeço também a minha irmã Ana Paula, pelo incentivo.

Ao meu namorado Fernando, que sempre esteve ao meu lado durante toda essa trajetória, tanto nos momentos felizes quanto nos momentos difíceis. Obrigada

por me apoiar em todas as minhas decisões e sempre me fazer acreditar que todos os meus objetivos poderiam ser alcançados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o andamento deste trabalho.

“Acredite em seus sonhos, acredite em você.”

Anônimo.

RESUMO

Corynebacterium pseudotuberculosis é uma bactéria gram-positiva causadora da Linfadenite Caseosa (LC) em caprinos e ovinos. A LC é uma doença infectocontagiosa crônica que prejudica a produção de carne, leite e lã em vários países, incluindo o Brasil. Uma vez que o tratamento da doença é muitas vezes inviável e ineficaz, a eliminação dos animais infectados no rebanho tem sido uma das principais medidas de contenção da enfermidade. Vários grupos de pesquisa vem se dedicando ao estudo de *C. pseudotuberculosis* visando a identificação de fatores moleculares envolvidos na virulência e patogenicidade durante a infecção. Embora alguns destes componentes já tenham sido descritos, como a fosfolipase D, novos estudos são necessários para que seja possível compreender as diversas interações regulatórias que são intrínsecas a esse microrganismo, assim muitos grupos de pesquisas produzem de forma recombinante a enzima transaldolase de *C. pseudotuberculosis*, envolvida na glicólise e no metabolismo das pentoses-fosfato a fim de buscar inibidores que possam controlar sua ação enzimática. Nesse contexto, os flavonoides são compostos polifenólicos encontrados nas plantas e, em alguns casos, atuam como inibidores de infecções por microrganismos. Assim, a motivação deste trabalho consistiu em identificar e quantificar uma possível interação do flavonoide morina com a enzima transaldolase, a fim de bloquear a atividade de replicação e infecção de LC. Deste modo os objetivos desse estudo foram realizar a expressão, purificação, a caracterização da estrutura secundária e estabilidade térmica por dicróismo circular e verificação de interação entre transaldolase e morina por espectroscopia de fluorescência da proteína transaldolase. Os resultados da expressão mostram que a proteína transaldolase com 40kDa foi purificada em cromatografia de afinidade seguida de cromatografia de exclusão molecular. A sua estrutura secundária apresentou 74% de alfa hélice, 0% de folha beta, 7,9% de alças e 18,1 % de estruturas aleatórias. A análise da desnaturação térmica mostrou que a temperatura de *melting* foi de 48°C, indicando que a proteína é estável. A interação entre Morina e Transaldolase apresentou mecanismo de supressão estáticodinâmico, com uma constante de associação moderada e um sítio de interação. A análise termodinâmica mostrou que o processo de interação é espontâneo $\Delta G < 0$, endotérmico $\Delta H > 0$ e entrópico $\Delta S < 0$. Assim, sabendo-se que a proteína Transaldolase é a proteína chave no processo das infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e considerando as propriedades antibacterianas e antiproliferativas do flavonoide morina, sugere-se

que este composto possa ser investigado para os seus usos específicos. Sugere-se que a interação da transaldolase com a Morina possa exercer um papel de carreador ou seja, uma forma pela qual a proteína leva a molécula para o local que ela atua, e, assim, a Morina consiga realizar sua função antiproliferativa e bloquear as infecções.

Palavras-Chaves: *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Transaldolase. Morina. Espectroscopia de fluorescência.

ABSTRACT

Corynebacterium pseudotuberculosis is a gram-positive bacterium which causes Caseous Lymphadenitis (CL) in small ruminants. CL is a chronic infectious disease which impairs meat, wool and milk production in many countries including Brazil. Once the treatment for CL is not efficient, removing affected animals from herds represents one of the major strategies to prevent the disease from spreading. Many research groups have been looking for molecular components in *C. pseudotuberculosis* that are involved in virulence and infection, among which phospholipase D stands out as the major one described so far. However, new studies are necessary for the understanding of the microorganism's biology, including its intrinsic regulation mechanisms. The object of study of this work was the enzyme transaldolase involved in glycolysis and in the metabolism of pentoses-phosphate, necessary for the formation of nucleic acids that the bacterium uses to replicate in order to find inhibitors that can control its enzymatic action. In this context, flavonoids are polyphenolic compounds found in plants and, in some cases, act as inhibitors of infections by microorganisms. Thus, the purpose of this work is to identify and quantify a possible interaction of the flavonoid morin with the enzyme transaldolase, in order to block LC's replication activity and infection. The objectives of this study included expression and purification of *C. pseudotuberculosis*'s transaldolase protein, the characterization of the secondary structure and thermal stability by circular dichroism and the study of the interaction between transaldolase and morin by fluorescence spectroscopy. The transaldolase protein, with approximately 40kDa, was purified on affinity chromatography followed by molecular exclusion chromatography. Its secondary structure had 74% of alpha helix, 0% of beta sheet, 7.9% of loops (turn) and 18.1% of random structures. The thermal denaturation analysis showed that the melting temperature is 48 °C, indicating that the protein is stable. The interaction between Morina and Transaldolase presented a static-dynamic suppression mechanism, with a moderate association constant and one interaction site. The thermodynamic analysis showed that the interaction process is spontaneous $\Delta G < 0$, endothermic $\Delta H > 0$ and entropic $\Delta S < 0$. Thus, with the knowledge that Transaldolase protein is the key protein in the process of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections and considering the antibacterial and antiproliferative properties of the flavonoid morine, it is suggested that this compound can be investigated for its specific

uses. It is suggested that the interaction of transaldolase with Morina may play a role of carrier, that is, a way in which the protein takes the molecule to the place it acts, and thus Morina can perform its antiproliferative function and block the Infections.

Keywords: *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Transaldolase. Morin. Fluorescence spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Degradação da glicose na via glicolítica. No primeiro estágio (reações 1 a 5), uma molécula de glicose é fosforilada e clivada para formar duas moléculas de triose (gliceraldeído-3-fosfato), em uma série de reações que consomem 2 ATPs. No segundo estágio da glicólise (reações 6 a 10), as duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são convertidas em duas moléculas de piruvato, gerando 4 ATPs e 2 NADH (VOET, 2002).28
- Figura 2** - O mecanismo de clivagem do aldol catalisado por uma base. A condensação de aldol ocorre pelo mecanismo inverso (VOET, 2002).29
- Figura 3** - Via das pentoses-fosfato. O número de linhas em uma seta representa o número de moléculas reagindo em uma volta da via, de modo a converter 3 G6P em 3 CO₂, 2 F6P e 1 GAP (VOET, 2002). 31
- Figura 4** - Mecanismo da transaldolase. A transaldolase contém um resíduo essencial de lisina (Lys) que facilita uma reação de clivagem aldólica da seguinte maneira: 1) um grupo ε-amino de Lys forma uma base de Schiff com o grupo carbonila da S7P; 2) um carbânion C₃ estabilizado pela base de Schiff forma-se em uma reação de clivagem aldólica entre C₃ e C₄ que elimina E4P; 3) o carbânion ligado à enzima estabilizado por ressonância é adicionado ao átomo C da carbonila do GAP, formando F6P ligada à enzima via base de Schiff; 4) a base de Schiff é hidrolisada, regenerando a enzima ativa e liberando F6P (VOET, 2002). 33
- Figura 5** - Inter-relação entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato. A via das pentoses-fosfato, que começa com a G6P produzida na Etapa 2 da glicólise, gera NADPH para uso nas reações de redução e R5P para síntese de nucleotídeos. O excesso de R5P é convertido em intermediários glicolíticos por uma sequência de reações que pode operar no sentido inverso e gerar R5P adicional, se necessário (VOET, 2002).34
- Figura 6** - Albert Szent-Gyorgyi e sua vitamina P. a) Albert Szent-Gyorgyi (1893-1986); b) Estrutura química da rutina (inicialmente denominada de vitamina P). 35
- Figura 7** - Estrutura dos principais grupos de flavonoides. a) Estrutura básica dos flavonoides; b) Isoflavonoide; c) Neoflavonoide. Adaptado de PINHEIRO, JUSTINO, 2012. 36
- Figura 8** - Estrutura da morina (LIANDA; CASTRO, 2008).37
- Figura 9** - Espectros de Dicroísmo Circular referentes à alfa hélice, folha beta e *random coil*. Adaptado de FASMAN, 1996. 39
- Figura 10** - Mecanismo de supressão estático e dinâmico. a) No mecanismo de supressão estático as altas temperaturas causam uma desestabilização do complexo ocasionando uma diminuição das constantes de supressão, enquanto no b) mecanismo de supressão colisional as altas temperaturas favorecem a difusão das moléculas incrementando, assim, a constante de supressão (LAKOWICZ, 1999).....44
- Figura 11** - SDS-PAGE 15% corado com *Comassie* referente ao teste de expressão da proteína Transaldolase. Coluna 1: M (Marcador de peso molecular), Coluna 2: 1 (Amostra antes da indução – clone 1), Coluna 3: 2 (2 horas após indução – clone 1), Coluna 4: 3 (6 horas após indução – clone 1), Coluna 5: 4 (16 horas após indução –

clone 1), Coluna 6: 5 (Amostra antes da indução - clone 2), Coluna 7: 6 (2 horas após indução - clone 2), Coluna 8: 7 (6 horas após indução - clone 2), Coluna 9: 8 (16 horas após indução - clone 2).	55
Figura 12 - SDS-PAGE - Cromatografia de afinidade com His60 Ni para a proteína Transaldolase. Coluna 1: M (Marcador de peso molecular), Coluna 2: 1 (Sobrenadante), Coluna 3: 2(Tampão de lise com 5 mM de Imidazol), Coluna 4: 3 (Lavagem com 10 mM de imidazol), Coluna 5: 4 (Lavagem com 20 mM de imidazol), Coluna 6: 5 (Eluição com 40 mM de imidazol), Coluna 7: 6 (Eluição com 100 mM de imidazol), Coluna 8: 7 (Eluição com 400 mM de imidazol); Coluna 9: 8 (Lavagem com 600 mM de Imidazol).	56
Figura 13 - Cromatograma ilustrando padrão de eluição da proteína transaldolase utilizando-se cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 GL 10/30 pré-empacotada acoplada ao equipamento AKTA <i>purifier</i> (sistema automatizado). A coluna foi previamente equilibrada com tampão contendo 50 mM de NaF e 50 mM de NaH ₂ PO ₄ , pH 8,5. O cromatograma apresentou uma banda de absorção máxima no UV:58 nm	58
Figura 14 - SDS-PAGE 15% corado com <i>Comassie</i> referente a purificação da proteína transaldolase utilizando-se cromatografia de gel filtração em sistema AKTA <i>purifier</i> . Coluna 1: M (Marcador de peso molecular); Coluna 2: 1 (Amostra 1 referente ao pico de 58 nm da Exclusão Molecular); Coluna 3: 2 (Amostra 2 referente ao pico de 58 nm da Exclusão Molecular); Coluna 4: 3 (Amostra 3 referente ao pico de 58 nm da Exclusão Molecular).	58
Figura 15 - Espectro de absorção de UV-Vis do flavonoide morina, mostrando a absorbância pelo comprimento de onda. A morina foi diluída e titulada em DMSO..	59
Figura 16 - Espectro de emissão de fluorescência do sistema transaldolase-morina (T= 298 K, λ_{exc} = 290nm, Concentração de transaldolase = 3 μ M) em tampão 50 mM de NaF e 50 mM de NaH ₂ PO ₄ , pH 8,5. Verifica-se a supressão da fluorescência com o aumento da concentração de Morina na solução de proteína (indicada pela seta). Os espectros correspondentes à 303 e 310K apresentaram o mesmo perfil.	60
Figura 17 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da Transaldolase pela Morina em 298, 303 e 310 K. O coeficiente angular apresenta o valor de K_{sv}	62
Figura 18 - Gráfico duplo-log para a supressão de fluorescência da Transaldolase (λ_{exc} = 290 nm) pela Morina em 298, 303 e 310 K. [Transaldolase] = 3 μ M em tampão 50 mM de NaF e 50 mM de NaH ₂ PO ₄ , pH 8,5.	65
Figura 19 - Gráfico de Van't Hoff (lnK vs 1/T) para o complexo Transaldolase-flavonoide para as temperaturas de 298, 303 e 310 K.	66
Figura 20 - Perfil termodinâmico da interação entre Transaldolase e Morina.	68
Figura 21 – Espectro de Dicroísmo Circular da transaldolase. A concentração de proteína utilizada para este experimento foi de 0,6 μ M em cubeta com caminho óptico de 5,0 mm. A linha contínua corresponde ao espectro de CD e a representação em círculos corresponde ao ajuste dos dados experimentais obtidos da deconvolução do espectro de CD. A proteína apresenta 74% de alfa hélice, 0% de folha beta, 7,9% de alças (<i>turn</i>) e 18,1 % de estruturas aleatórias. A proteína estava em tampão com 50 mM de NaF e 50 mM de NaH ₂ PO ₄ , pH 8,5.	69

- Figura 22** - Desnaturação Térmica da proteína Transaldolase entre 20 e 80 °C em comprimento de onda de 222 nm, a 1 °C/min em cubeta com caminho óptico de 5 mm, apresentando $T_m = 48$ °C. A proteína estava em tampão com 50 mM de NaF e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8,5. 70
- Figura 23** - DSC do processo de desenovelamento da Transaldolase. A curva de excesso de capacidade de calor aparente foi registrada para Transaldolase (23 μM) em tampão fosfato de sódio (20 mM de NaH_2PO_4 e 100 mM de NaF, pH= 8,0) com taxa de aquecimento de 1°C/min. 71
- Figura 24** - Alinhamento entre os resíduos de aminoácidos da proteína Transaldolase em *C. pseudotuberculosis* e as espécies: *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus* e *Homo sapiens*. Em destaque são os resíduos de aminoácidos que fazem parte do sítio ativo, ácido Aspártico (28D), Treonina (56T) e uma Asparagina (58N), ácido glutâmico (124E), lisina (160K), asparagina (183N) e treonina (185T), serina (222S) e fenilalanina (224F). 73
- Figura 25** - Alinhamento estrutural do modelo da Proteína Transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, juntamente com aquelas obtidas das espécies: *Corynebacterium glutamicum* (76 %), *Thermotoga marítima* (39 %), *Neisseria gonorrhoeae* (38%), *Bacillus subtilis* (32 %), *Thermus thermophilus* (32 %) e *Homo sapiens* (28 %), apontando as diferenças estruturais entre a *C. Pseudotuberculosis* (azul), *Thermotoga marítima*, *Bacillus subtilis* e *Thermus thermophilus* (vermelho, amarelo e verde) e *Homo sapiens* (magenta). 75
- Figura 26** - Estrutura tridimensional representada em cartoon, mostrando a estrutura da proteína Transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e os respectivos resíduos de aminoácidos, juntamente com as espécies *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus* e *Homo sapiens*. Em amarelo temos resíduos de Lisina (160), em magenta Treonina e Asparagina (56 e 58), em Azul Claro Serina e Fenilalanina (222 e 224), em vermelho Asparagina e Treonina (183 e 185), em verde ácido aspártico (28) e em azul ácido glutâmico (124). 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características da proteína transaldolase geradas pelo programa ProtParam.....	54
Tabela 2 - Valores de K_{sv} obtidos na interação realizada entre a proteína Transaldolase e o flavonoide Morina para diferentes temperaturas.....	62
Tabela 3 – Constantes de ligação K_b e número de sítios de ligação n para a reação de transaldolase com o flavonoide morina em diferentes temperaturas (298, 303 e 310 K).	65
Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos do complexo Transaldolase-Morina em 298,303 e 310K.....	66
Tabela 5 - Porcentagem de identidade (%) de cada sequência usada em relação a Transaldolase de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPG	Bisfosfoglicerato
C	Concentração
CD	Dicroísmo circular
DHAP	Diidroxiacetona-fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
E4P	Eritrose-4-fosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FBP	Frutose-1,6-bifosfato
F6P	Frutose-6-fosfato
g	Gramas
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
G6P	Glicose-6-fosfato
G6PDH	Glucose-6-fosfato desidrogenase
HK	Hexocinase
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
h	Horas
kDa	Kilo Daltons
LB	Luria Bertani
LC	Linfadenite Caseosa
Lys	Lisina
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
Mg	Miligrama
Mm	Milímetros
μ L	Microlitros

NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADP	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato
NADPH	Dinucleotídeo de adenina e nicotinamida fosfato (forma reduzida)
Nm	Nanômetros
Ng	Nanogramas
OD	Densidade óptica
PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK	Fosfofrutocinase
PG	Fosfoglicerato
PGI	Fosfoglicose-isomerase
PGM	Fosfoglicerato-mutase
PGK	Fosfoglicerato-cinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PK	Piruvato-cinase
rpm	Rotações por minuto
R5P	Ribose-5-fosfato
Ru5P	Ribulose-5-fosfato
s	Segundos
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
S7P	Sedoeptulose-7-fosfato
TIM	Triose-fosfato-isomerase
UV-Vis	<i>Ultraviolet-Visible</i> (Ultravioleta-Visível)
V	Volt
Xu5P	Xilulose-5-fosfato

LISTA DE SÍMBOLOS

ε	Coeficiente de extinção molar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
F_0	Intensidade de fluorescência na ausência de supressor
F	Intensidade de fluorescência na presença de supressor
K_D	Constante dinâmica
K_S	Constante estática
k_q	Constante de supressão bimolecular
$[Q]$	Concentração de ligante
τ_0	Tempo de vida de fluorescência na ausência de supressor
K_{SV}	Constante de supressão de Stern-Volmer
n	Número de sítios de ligação
K_b	Constante de ligação
R	Constante universal dos gases
$[P]$	Concentração total de proteína
ΔH^0	Varição de entalpia
ΔS^0	Varição de entropia
T	Temperatura
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
ΔG^0	Varição de energia livre de Gibbs
L_F	Concentração de ligante livre
L_T	Concentração total de ligante
K_a	Constante de associação
λ	Comprimento de onda
f_k	Fração de estrutura secundária
θ_{λ}	Espectro de CD da proteína
θ_{λ}^k	Espectro padrão da estrutura secundária k.
f_D	Fração de proteína desnaturada
f_N	Fração de proteína no estado nativo

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	23
1.1 - <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e a Linfadenite Caseosa.....	23
1.2 – Glicólise e Aldolases	26
1.3 – Via das pentoses-fosfato e enzima transaldolase	30
1.4 – Flavonoides	35
1.4.1 - Histórico.....	35
1.4.2 – Estrutura, Nomenclatura e Classificação	36
2 – JUSTIFICATIVA.....	38
3 – OBJETIVOS.....	38
3.1 – Objetivo Geral	38
3.2 - Objetivos Específicos.....	38
4 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS	39
4.1 – Medidas de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	39
4.2 – Medidas de Espectroscopia de Fluorescência	42
4.3 - Mecanismo de supressão estático.....	42
4.3.1- Mecanismo de supressão dinâmico	44
4.3.2 - Desvio da equação de Stern-Volmer.....	45
a) Modelo combinado de supressão estático-dinâmico	45
b) Modelo da esfera de ação.....	45
4.4 - Determinação dos parâmetros termodinâmicos	46
4.5 - Análise por Bioinformática	47
5- MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
5.1 - Transformação em célula competente (<i>Escherichia coli</i> - TOP 10).....	48
5.2 - Purificação do plasmídeo para propagação	48
5.3 - Transformação em <i>E. coli</i> linhagem BL21 RIL.....	48
5.4 - Teste de expressão da proteína Transaldolase	49
5.5 - Purificação da proteína Transaldolase por cromatografia de afinidade (Ni-NTA)	50
5.6 - Purificação da proteína Transaldolase por cromatografia de exclusão molecular através do sistema AKTA purifier.....	51
5.7- Determinação da Concentração da Proteína	52
5.8 - Preparo das soluções de proteína e flavonoide	52
5.9 – Medidas de Espectroscopia de Dicroísmo Circular	52
5.10 – Medidas de Espectroscopia de Fluorescência	53
5.11- Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	53
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

6.1 - Caracterização da Proteína Transaldolase por meio do programa Expasy-ProtParam	54
6.2 - Expressão da Proteína Transaldolase.....	55
6.3 - Purificação da Proteína Transaldolase	56
6.3.1 – Cromatografia de afinidade	56
6.3.2 – Cromatografia por Exclusão Molecular	57
6.4 – Interação entre a proteína transaldolase e o flavonoide morina por análises espectroscópicas	59
6.4.1 – Espectroscopia de absorção UV-Vis.....	59
6.4.2 – Titulações Espectrofluorimétricas	59
6.4.3 - Cálculo dos parâmetros de interação.....	63
6.4.4 - Análise Termodinâmica	66
6.5 – Espectros de Dicroísmo Circular para a transaldolase.....	68
6.6 - Estabilidade térmica da Transaldolase por DSC	70
6.7 - Análise por Bioinformática	71
7 - CONCLUSÕES	76
8 - REFERÊNCIAS.....	78

1- INTRODUÇÃO

1.1 - *Corynebacterium pseudotuberculosis* e a Linfadenite Caseosa

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo dos actinomicetos, que também engloba outros microrganismos patogênicos para animais, incluindo, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* (DORELLA et al., 2006). Essas 8 bactérias gram-positivas pertencem ao grupo CMNR e compartilham certas características da parede celular incluindo espessura, presença de ácidos micólicos, ácidos graxos saturados e insaturados, além de um alto conteúdo das bases guanina e citosina no seu genoma (BAYAN et al., 2003; DORELLA et al., 2006).

Corynebacterium pseudotuberculosis são bactérias intracelulares facultativas (PATON et al., 2003; BAIRD, FONTAINE, 2007), pleomórficas, imóveis, desprovidas de esporos (MEYER et al., 2005; MCKEAN, DAVIES, MOORE, 2007), medindo entre 0,5 - 0,8 µm por 1,0 – 3,0 µm (COSTA, 2002). São microaerófilos (5% de gás carbônico), mas toleram condições de aerofilia em meios de cultura (LEARDINI et al., 2002).

Esse microrganismo possui variações bioquímicas, principalmente quanto a sua habilidade de fermentação. São catalase e urease positivos, fermentam carboidratos (ribose e glicose) sem a produção de gás, e não fermentam a lactose (COSTA, 2002). Não possuem atividade proteolítica, sendo, portanto, incapazes de hidrolisar a gelatina ou digerir a caseína (QUINN et al., 1994; SONGER et al., 1998). Além disso, apresentam multiplicação facilitada em temperaturas ao redor de 37°C (GUEDES, 2015; COSTA, 2002).

C. pseudotuberculosis possui dois biotipos denominados *ovis* e *equi*, que são classificados pela sua capacidade ou incapacidade de produzir a enzima nitrato-redutase, a qual permite a conversão do nitrato em nitrito (LEARDINI et al., 2002; BELCHIOR et al., 2006). O biotipo *equi* é capaz de reduzir o nitrato a nitrito, enquanto o biotipo *ovis* não possui essa característica (COSTA, 2002). Assim, a classificação dos biotipos de *C. pseudotuberculosis* por técnicas de biologia molecular, particularmente usando PCR e enzimas de restrição, tem ratificado a

classificação com base bioquímica pela redução ou não do nitrato (BAIRD, FONTAINE, 2007).

Os fatores de virulência desse gênero tem papel fundamental na adesão, invasão, colonização, propagação e na evasão do sistema imune do hospedeiro (GUEDES, 2015). A enzima fosfolipase D é encontrada nas linhagens de *C. pseudotuberculosis* (SONGER et al., 1988) e possui ação de exotoxina glicoproteica ou citotoxina capaz de hidrolisar a esfingomielina, enfraquecendo as membranas celulares do hospedeiro e favorecendo a infecção pelo microrganismo (PEPIN, BISRAMÉ, MARLY, 1989; BAIRD, FONTAINE, 2007). A fosfolipase D ativa os íons cálcio e magnésio e promove a lise de eritrócitos ovinos e bovinos nos meios de cultura (SMITH, 2003), sendo considerada o principal fator de virulência de *C. pseudotuberculosis* (LIPSKY et al., 1982; HODGSON et al., 1999).

Esse patógeno tem sido relacionado, em diferentes países, a diversas síndromes clínicas nos equídeos e em ruminantes domésticos em geral, caracterizadas pela formação de abscessos e/ou linfangite (DOHERR et al., 1998). No entanto, pelo menos 25 casos de infecção em humanos por *C. pseudotuberculosis* já foram descritos, sendo que a maior parte deles foi associada principalmente ao contato com animais portadores da bactéria (DOHERR et al., 1998).

Em ovinos e caprinos as infecções causadas por *C. pseudotuberculosis* determinam a linfadenite caseosa (LC), doença popularmente conhecida como “mal do carço”, “furúnculo ovino” ou “síndrome da ovelha magra” (PAULE et al., 2003), que possui importância mundial em decorrência da alta prevalência e prejuízos econômicos causados nos rebanhos (BINNS, BAILEY, GREEN, 1999; RIBEIRO et al., 2001; BAIRD, FONTAINE, 2007). A LC é caracterizada por um quadro de abscesso dos linfonodos que apresentam material seco e provoca a redução na produção de carne e leite, depreciação da lã, gastos com tratamento e honorários veterinários, retardo no desenvolvimento dos animais, condenação de carcaças, deficiências nos índices reprodutivos do rebanho, descarte precoce e morte ocasional de animais (RIBEIRO et al., 2001; VALE et al., 2003; RADOSTITS, BLOOD, GAY, 2007).

A linfadenite caseosa tem ampla distribuição no continente europeu, estando presente, por exemplo, na França, Inglaterra, Holanda e Espanha. Casos dessa doença também já foram descritos na Oceania e Américas, abrangendo a Austrália, os Estados Unidos, Cuba e Venezuela (BAIRD, FONTAINE, 2007; RUIZ *et al.*, 2007). O Brasil tem relatado altos índices de prevalência da LC principalmente na região nordeste, onde se concentra a maior parte dos rebanhos caprinos no país. No entanto, há relatos de que a prevalência da LC pode alcançar 80% das cabras e ovelhas nos criadouros do sudeste brasileiro (ANDRADE, 2012).

A LC é geralmente introduzida em rebanhos sadios por animais adquiridos onde há histórico de infecção por *C. pseudotuberculosis*. Estudos sugerem que sua transmissão ocorra principalmente pela via cutânea, uma vez que procedimentos comuns que geram feridas na pele - como tosa, castração e marcações de animais - parecem contribuir para a disseminação da doença. Entretanto, a alta incidência de lesões intratorácicas decorrentes da LC em animais que são mantidos em confinamento pode ser um indício de que a transmissão também ocorre pela via aérea (KURIA *et al.*, 2001; DORELLA *et al.*, 2006).

O procedimento mais indicado para o controle dessa enfermidade nos rebanhos inclui a remoção dos animais infectados e a vacinação dos animais sadios (GUIMARÃES *et al.* 2009). No entanto, tais medidas apresentam baixa eficácia devido ao diagnóstico tardio da doença (em estágio clínico avançado) e à indisponibilidade de vacinas comerciais capazes de conferir altos índices de proteção (DORELLA *et al.*, 2006; DORELLA *et al.*, 2009). Devido a formação e desenvolvimento de lesões granulomatosas, o tratamento com antibióticos se torna um procedimento com baixa possibilidade de sucesso, pois a formação da cápsula do abscesso torna quase impossível a difusão dos antibióticos para a região da lesão em si, impedindo o contato da bactéria com o fármaco (SANTIAGO *et al.*, 2013).

Em bovinos e equinos a *C. pseudotuberculosis* provoca, respectivamente, a linfangite ulcerativa e o abscesso peitoral ("febre dos pombos" ou garrotilho das terras secas) (BAIRD, SYNGE, DERCKSEN, 2004; BAIRD, FONTAINE, 2007),

também associados a grandes prejuízos nos plantéis (DOHERR, et al., 1998; RADOSTITS, BLOOD, GAY, 2007).

C. pseudotuberculosis é capaz de sobreviver fora do organismo hospedeiro e resistir a diversas situações ambientais que podem prejudicar sua homeostase. Ao infectar o hospedeiro, essa bactéria é exposta a condições que também são desfavoráveis ao seu estabelecimento, precisando resistir aos mecanismos de defesa do hospedeiro e também aos efeitos da baixa disponibilidade de oxigênio (hipóxia) (MCKEAN et al., 2007a; 2007b).

Neste contexto, as proteínas secretadas por esse patógeno parecem desempenhar papel importante para a neutralização dos mecanismos de ação do hospedeiro, colaborando para a manutenção da homeostase durante a infecção (BHASVAR et al., 2007). Dessa forma, com o objetivo de identificar alvos importantes para o processo infeccioso e controle da LC, este trabalho buscou realizar a caracterização da proteína transaldolase secretada por *C. pseudotuberculosis*. Essa enzima produz açúcares fosforilados pela via da pentose fosfato para a formação de ácidos nucleicos que a bactéria utiliza para se replicar, e, assim, uma forma eficiente de afetar o local que essa proteína atua é por meio do uso de moléculas (como, por exemplo, a morina) que, uma vez interagindo com a transaldolase, possam interferir na atividade da mesma.

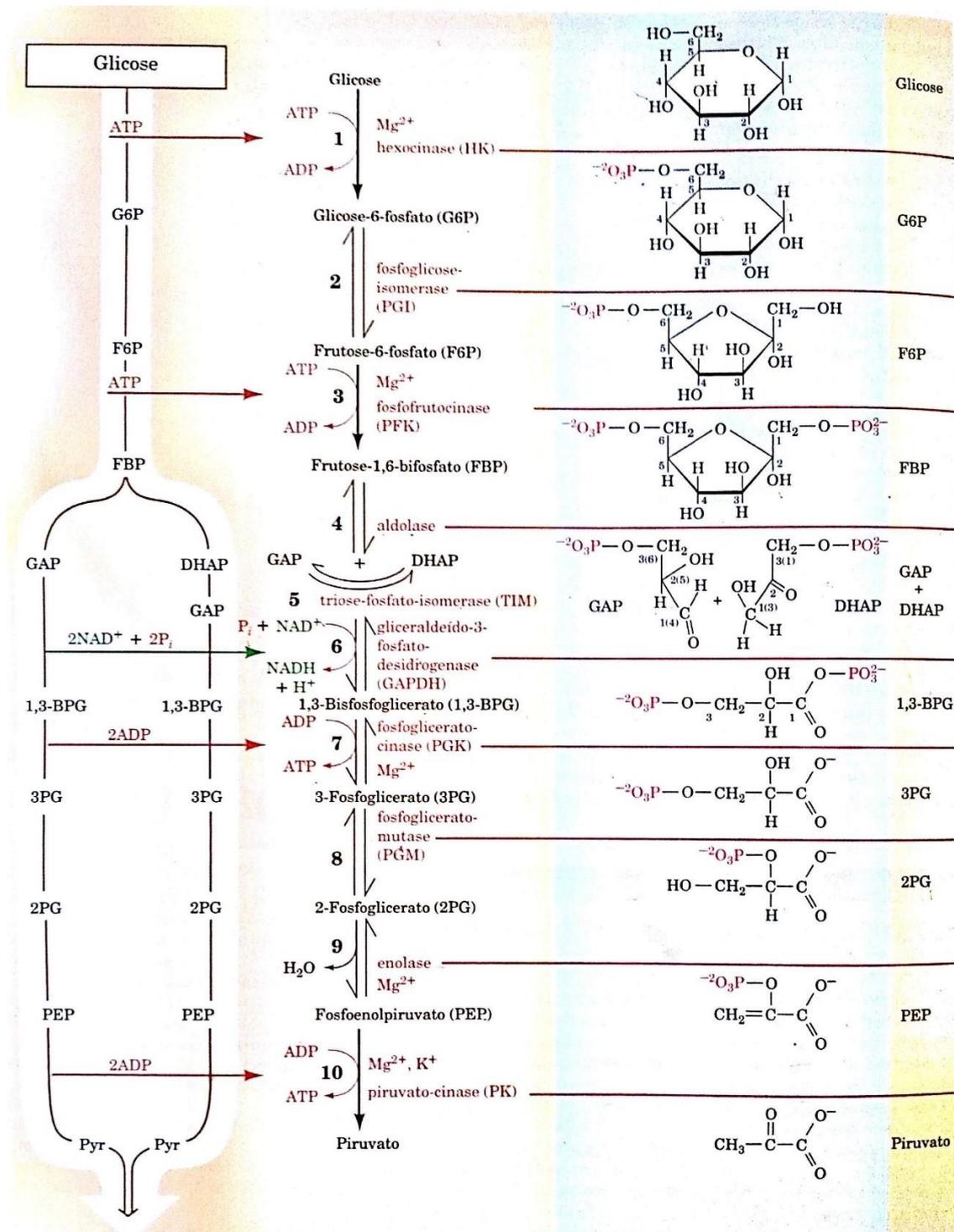
1.2 – Glicólise e Aldolases

Diversas proteínas de *Corynebacterium pseudotuberculosis* estão envolvidas em doenças acarretadas por este patógeno. Dentre essas, há a transaldolase, uma enzima envolvida na glicólise e no metabolismo das pentoses-fosfato, apresentando atividade predominantemente citoplasmática. No entanto, há situações em que ela pode ser recrutada e exposta na superfície celular, através de uma via não clássica ou de um mecanismo de translocação ainda não elucidado. Neste caso, a transaldolase pode atuar na adesão ou agregação bacteriana durante a colonização bacteriana no hospedeiro (GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ et al., 2012).

A glicólise corresponde à via metabólica pela qual a glicose é convertida em duas moléculas de três carbonos, o piruvato, pela frutose-1,6-bifosfato (FBP),

com a produção concomitante de dois mols de Adenosina Trifosfato (ATP) por mol de glicose. Essa sequência de 10 reações enzimáticas, que é provavelmente a rota bioquímica melhor compreendida, tem um papel central no metabolismo energético por produzir uma porção significativa da energia utilizada pela maioria dos organismos e por preparar a glicose, e também outros carboidratos, para a degradação oxidativa. As 10 reações da glicólise (Figura 1), apresenta um papel central no metabolismo energético por produzir uma porção significativa da energia utilizada pela maioria dos organismos e por preparar a glicose, e também outros carboidratos, para a degradação oxidativa (VOET, 2002).

Figura 1 – Degradação da glicose na via glicolítica. No primeiro estágio (reações 1 a 5), uma molécula de glicose é fosforilada e clivada para formar duas moléculas de triose (gliceraldeído-3-fosfato), em uma série de reações que consomem 2 ATPs. No segundo estágio da glicólise (reações 6 a 10), as duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são convertidas em duas moléculas de piruvato, gerando 4 ATPs e 2 NADH (VOET, 2002).



Assim, a glicólise pode ser dividida em dois estágios:

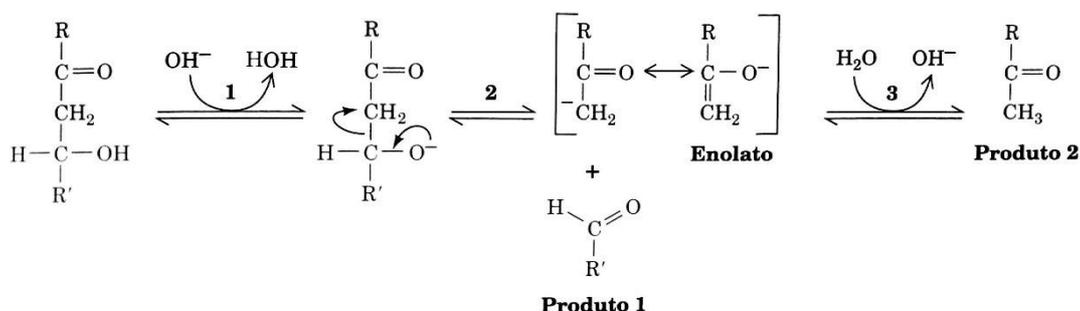
1º) Investimento de energia (reações 1 a 5). Nessa etapa preparatória, a hexose-glicose é fosforilada e clivada para gerar duas moléculas da triose gliceraldeído-3-fosfato em um processo que consome 2 ATPs (VOET, 2002);

2º) Recuperação de energia (reações 6 a 10). As duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato são convertidas em piruvato, com a geração de 4 ATPs. A glicólise, dessa forma, tem um “lucro” líquido de 2 ATPs por glicose (VOET, 2002).

Os grupos fosfato transferidos de início do ATP para a hexose não resultam em compostos de “alta energia” imediatamente. No entanto, as transformações enzimáticas subsequentes convertem esses produtos de “baixa energia” em compostos com alto potencial de transferência de grupos fosfato, capazes de fosforilar ADP para formar ATP (VOET, 2002).

Analisando detalhadamente as enzimas envolvidas na glicólise, temos que a enzima transaldolase de *C. pseudotuberculosis* pertence à classe das aldolases. A aldolase catalisa a quarta reação da glicólise, a clivagem da frutose-1,6-bifosfato (FBP) para formar as duas trioses gliceraldeído-3-fosfato (GAP) e diidroxiacetona-fosfato (DHAP) (VOET, 2002). Essa reação é uma clivagem de aldol (condensação reversa de aldol), cujo mecanismo não-enzimático, catalisado por uma base, é mostrado na Figura 2 (VOET, 2002).

Figura 2 - O mecanismo de clivagem do aldol catalisado por uma base. A condensação de aldol ocorre pelo mecanismo inverso (VOET, 2002).



A clivagem de aldol entre o C3 e o C4 da FBP requer uma carbonila no C2 e uma hidroxila no C4, resultando em dois compostos de C3 interconvertíveis que podem entrar em uma via de degradação idêntica. O intermediário enolato na clivagem de aldol é estabilizado pela ressonância resultante do caráter removedor de elétrons do átomo de oxigênio da carbonila (VOET, 2002).

Há dois tipos de aldolases classificadas de acordo com seus mecanismos de estabilização por enolato. As aldolases de classe 1 que ocorrem em animais e em plantas, e as aldolases de classe 2 que ocorrem em fungos, em algas e em

algumas bactérias (VOET, 2002). A enzima transaldolase de *C. pseudotuberculosis*, objeto de estudo deste trabalho, está inserida na classe 2 das aldolases. Nessa classe, um cátion divalente, em geral Zn^{2+} ou Fe^{2+} , polariza o oxigênio da carbonila do substrato para estabilizar o intermediário enolato da reação, (VOET, 2002).

1.3 – Via das pentoses-fosfato e enzima transaldolase

A transaldolase de *C. pseudotuberculosis* também está envolvida na via das pentoses-fosfato, a qual pode ser vista como um processo alternativo ou complementar à glicólise, na oxidação da glicose. Nesta via, também designada de via do fosfogliconato ou de desvio (*shunt*) das hexoses monofosfato, não há formação de ATP. Suas principais funções são a formação de NADPH para a síntese de ácidos graxos e esteroides, assim como a síntese de ribose-5-fosfato para a formação de nucleotídeos e ácidos nucleicos (VOET, 2002).

A reação geral da via das pentoses-fosfato é (VOET, 2002):



NADPH é gerado pela oxidação da glicose-6-fosfato (Figura 3). A via das pentoses-fosfato pode ser considerada em três estágios (VOET, 2002): **Estágio 1)** Reações oxidativas (Figura 3, reações 1 a 3), que produzem NADPH e ribulose-5-fosfato (Ru5P) (VOET, 2002).

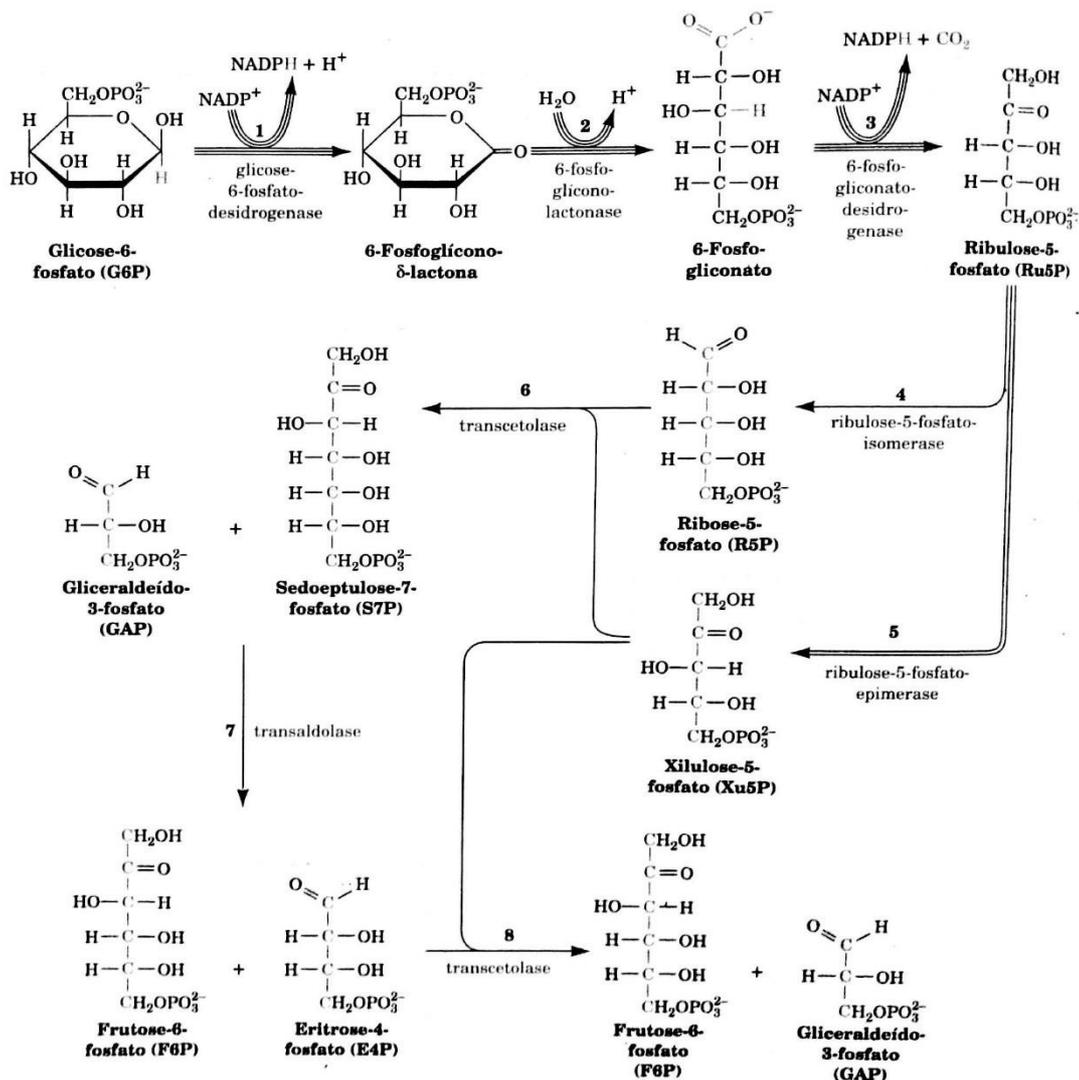


Estágio 2) Reações de isomerização e epimerização (Figura 3, reações 4 e 5), que transformam Ru5P em ribose-5-fosfato ou em xilulose-5-fosfato (Xu5P) (VOET, 2002).



Estágio 3) Uma série de reações de clivagem e a formação de ligação carbono-carbono (Figura 3, reações 6 a 8) que convertem duas moléculas de Xu5P e uma molécula de R5P em duas moléculas de F6P e uma molécula de GAP (VOET, 2002).

Figura 3 - Via das pentoses-fosfato. O número de linhas em uma seta representa o número de moléculas reagindo em uma volta da via, de modo a converter 3 G6P em 3 CO₂, 2 F6P e 1 GAP (VOET, 2002).

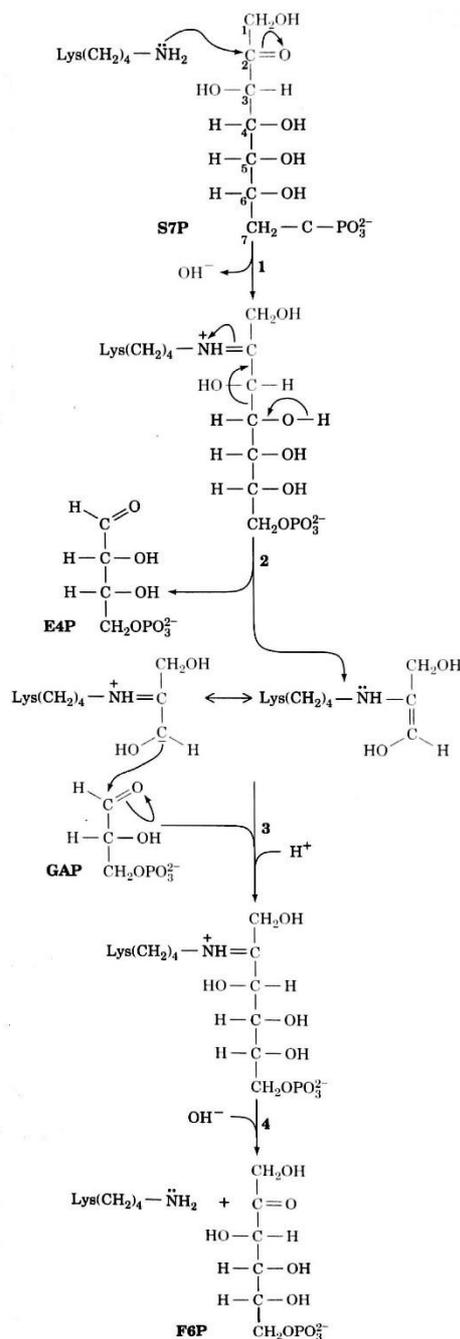


Os rearranjos dos átomos de carbono na terceira etapa da via das pentoses-fosfato podem ser seguidos mais facilmente observando-se a estequiometria. Cada três moléculas G6P que entram na via produzem três moléculas Ru5P no Estágio 1. Essas três pentoses, são, então, convertidas em uma molécula de R5P e duas de Xu5P (Figura 3, reações 4 e 5). A conversão desses três açúcares

C_5 em dois açúcares C_6 e um açúcar C_3 é catalisada pelas enzimas transaldolase e transcetolase (VOET, 2002).

A transcetolase catalisa a transferência de uma unidade de C_2 de Xu5P para R5P, produzindo GAP e sedoepulose-7-fosfato (S7P) (Figura 3, reação 6). A enzima transaldolase, por sua vez, catalisa a transferência de uma unidade de C_3 da S7P para GAP produzindo eritrose-4-fosfato (E4P) e F6P (Figura 3, reação 7). A reação ocorre pela clivagem aldólica, que começa com a formação de uma base de Schiff entre um grupo ϵ -amino de um resíduo essencial de lisina e o grupo carbonila de S7P (Figura 4).

Figura 4 - Mecanismo da transaldolase. A transaldolase contém um resíduo essencial de lisina (Lys) que facilita uma reação de clivagem aldólica da seguinte maneira: 1) um grupo ϵ -amino de Lys forma uma base de Schiff com o grupo carbonila da S7P; 2) um carbânion C_3 estabilizado pela base de Schiff forma-se em uma reação de clivagem aldólica entre C_3 e C_4 que elimina E4P; 3) o carbânion ligado ao átomo C da carbonila do GAP, formando F6P ligada à enzima via base de Schiff; 4) a base de Schiff é hidrolisada, regenerando a enzima ativa e liberando F6P (VOET, 2002).

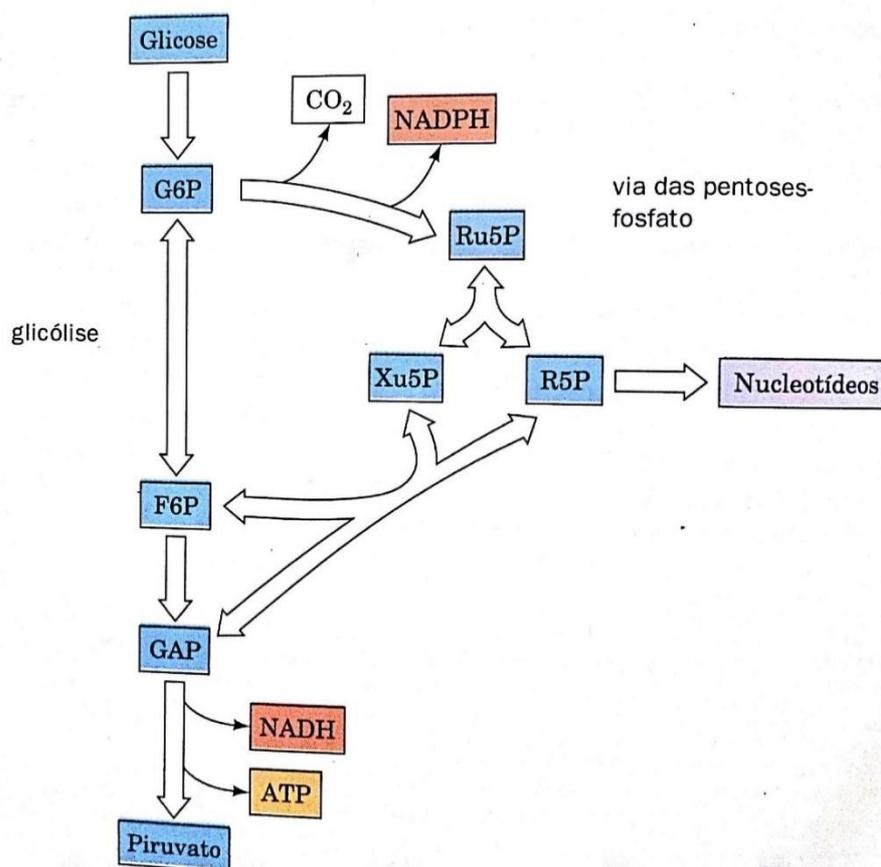


Assim, resumindo o processo de atuação da enzima transaldolase como um todo, pode-se dizer que os principais produtos da via das pentoses-fosfato são R5P e NADPH. As reações da transaldolase e transcetolase convertem o excesso de R5P em intermediários glicolíticos quando a necessidade metabólica

de NADPH excede a de R5P na biossíntese de nucleotídeos. O GAP e F6P resultantes podem ser consumidos pela glicólise e pela fosforilação oxidativa ou recicladas por gliconeogênese para formar G6P (VOET, 2002).

Quando a necessidade de R5P supera a necessidade de NADPH, de F6P e de GAP essas substâncias podem ser desviadas da via glicolítica para uso na síntese de R5P por meio das reações inversas da transaldolase e da transcetolase. A figura 5 traz a inter-relação entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato (VOET, 2002).

Figura 5 - Inter-relação entre a glicólise e a via das pentoses-fosfato. A via das pentoses-fosfato, que começa com a G6P produzida na Etapa 2 da glicólise, gera NADPH para uso nas reações de redução e R5P para síntese de nucleotídeos. O excesso de R5P é convertido em intermediários glicolíticos por uma sequência de reações que pode operar no sentido inverso e gerar R5P adicional, se necessário (VOET, 2002).



Dessa forma, a fim de evitar a síntese de nucleotídeos catalisada pela enzima transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, e, conseqüentemente, controlar a disseminação da linfadenite caseosa causada por esse patógeno, o presente trabalho tem como objetivo principal o estudo de ligantes que possam interagir com a transaldolase, inibindo sua ação enzimática.

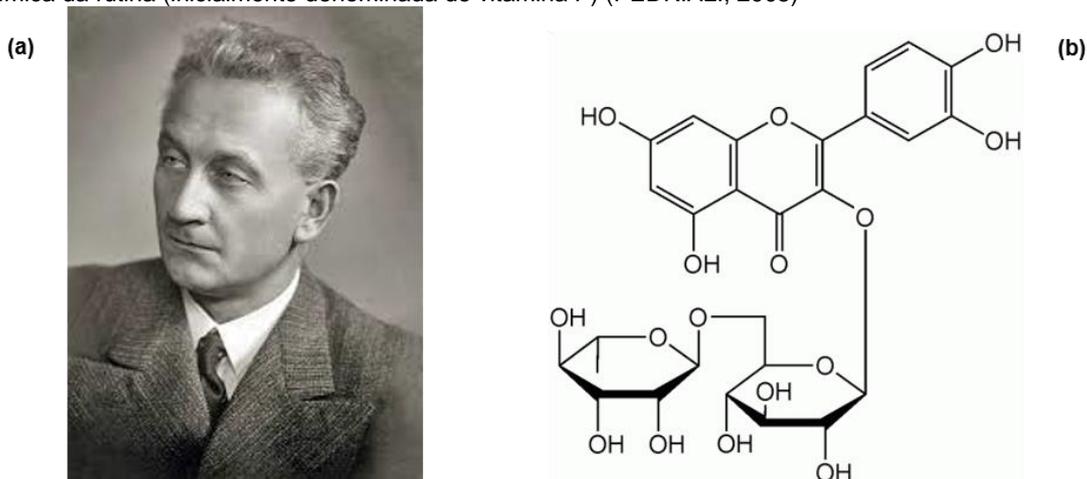
Entre esses compostos estão os flavonoides, em especial a morina, que foi escolhida por já ter apresentado efeito antiproliferativo (PEREIRA et al., 2015) e ser um provável agente antibacteriano.

1.4 – Flavonoides

1.4.1 - Histórico

Na década de 30, Albert Szent-Gyorgyi, ao trabalhar no isolamento da vitamina C em laranjas, encontrou outra substância que atuava de maneira sinérgica, sugerindo-se que seria uma nova classe de vitaminas (denominandoa de vitamina P). Anos depois, determinou-se que essa substância era um flavonoide que, atualmente, é conhecido por rutina (Figura 6) (NIJVELDT et al., 2001).

Figura 6 - Albert Szent-Gyorgyi e sua vitamina P. a) Albert Szent-Gyorgyi (1893-1986); b) Estrutura química da rutina (inicialmente denominada de vitamina P) (PEDRIALI, 2005)



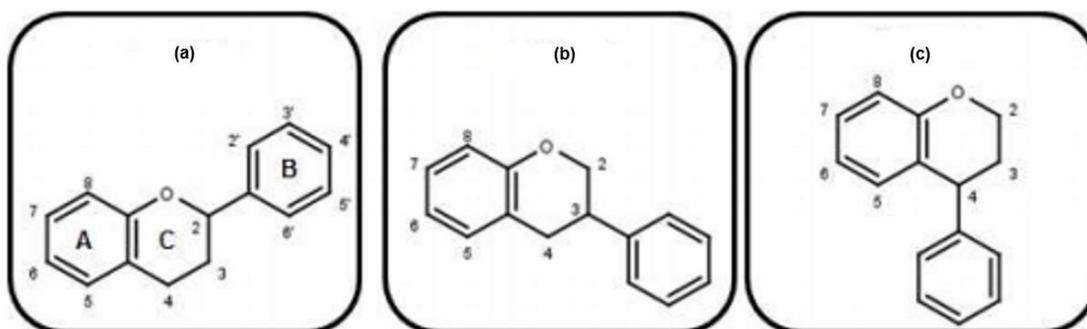
Nas décadas seguintes foi observado um aumento no interesse pela pesquisa com os flavonoides, principalmente pelos benefícios trazidos nos tratamentos de várias enfermidades como, por exemplo, a toxicemia na gestação, febre reumática, diabetes e câncer (PINHEIRO; JUSTINO, 2012), por apresentarem ações antimutagênicas e antioxidantes em sistemas biológicos (AVIRAM, FUHRMAN, 1998; LAMBERT, ELIAS, 2010), além de atuar como modulador anti-inflamatório (GOMES et al., 2008; SPENCER, VAUZOUR, RENDEIRO, 2009; SPENCER, 2010).

Além disso, alguns estudos mostraram que os flavonoides apresentam ação antimicrobiana, sendo relevantes nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, sejam fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos ou até mesmo animais superiores (LIMA, 2001; NIERO *et al.*, 2003).

1.4.2 – Estrutura, Nomenclatura e Classificação

Os flavonoides são compostos polifenólicos encontrados em plantas, frutas, chás, vinho, chocolate, entre outros. Podem estar em sua forma livre ou glicosilada, podendo diferir em seus substituintes (tipo, número e posição). Estruturalmente, são caracterizados por possuírem uma estrutura planar devido a um duplo enlace no anel aromático central (NIJVELDT, 2001). Todos os flavonoides compartilham uma estrutura esquelética básica de fenilbenzopirano C₆-C₃-C₆ (Figura 7a). A posição do anel fenólico relativo ao motivo benzopirano permite uma separação destes compostos em flavonoides (2-fenilbenzopirano), isoflavonoide (3-fenil-benzopirano) e neoflavonoide (4-fenilbenzopirano) (Figura 7) (PINHEIRO; JUSTINO, 2012).

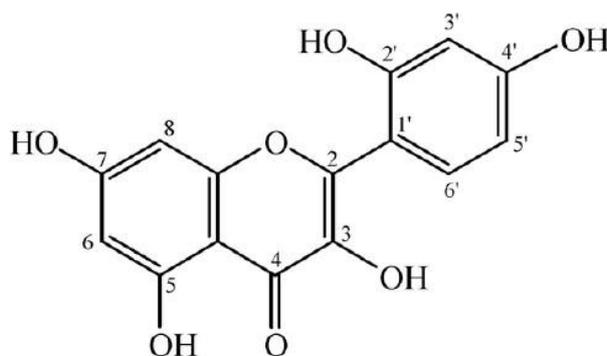
Figura 7 - Estrutura dos principais grupos de flavonoides. a) Estrutura dos flavonoides; b) Isoflavonoide; c) Neoflavonoide. Adaptado de PINHEIRO, JUSTINO, 2012.



Adicionalmente, os grupos se subdividem em classes, sendo os flavonoides mais comuns as flavonas (dupla ligação C₂-C₃ e radical C₄ oxo), flavonóis (flavonas com grupo 3-OH) e flavanonas (análogos de flavonas com uma ligação única C₂-C₃); as mais abundantes dos isoflavonoides incluem as isoflavonas (análogos das flavonas); e os mais abundantes dos neoflavonoides incluem as 4-arilcoumarina (dupla ligação C₃-C₄) e sua forma reduzida 3,4dihidro-4-arilcoumarina (PINHEIRO, JUSTINOL, 2012).

Um dos flavonoides mais estudados é a morina (2',3,4',5,7-pentahidroxifavona), um flavonol isolado a partir de várias espécies vegetais, como, por exemplo, *Chloroforatoria*, *Prumusdulcisraphanusativus L.*, *Lepidiumativum L.*, *Cayluseabyssinica*, entre outras espécies de plantas da família Moraceae (TAMIRU et al., 2012). Consiste em um importante composto bioativo por realizar interação com ácidos nucleicos, enzimas e proteínas (ZHANG et al., 2009). Esse flavonoide (Figura 8) exibe vários efeitos biológicos e bioquímicos, como atividades antioxidantes, antiproliferativas, antineoplásicas, anti-inflamatórias e cardioprotetoras (AL-NUMAIR et al., 2012; NASO et al., 2013).

Figura 8 - Estrutura da morina (LIANDA; CASTRO, 2008).



As ações farmacológicas dos flavonoides têm sido pesquisadas em diversas doenças causadas por microrganismos. Por este motivo, este trabalho tem como objetivo a avaliação da inibição da enzima transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis* pelo flavonoide morina. Como a transaldolase produz açúcares para a formação de ácidos nucleicos que são importantes para o processo de replicação da bactéria, um flavonol que possua a função de bloquear essa atividade de replicação e infecção poderia auxiliar no tratamento da linfadenite caseosa e de outras doenças causadas por *C. pseudotuberculosis*. Logo, a proposta deste trabalho consiste em identificar e quantificar uma possível interação da morina com a proteína transaldolase de *C. pseudotuberculosis*, a fim de verificar quais são as características desta interação.

2 – JUSTIFICATIVA

Tem sido feito um esforço considerável nos últimos anos para o desenvolvimento de fármacos e vacinas que sejam eficientes para o combate dessas doenças causadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis*. A *C. pseudotuberculosis* possui várias proteínas que estão envolvidas nos mecanismos de suas patologias, como a transaldolase, que pertence à via das pentoses-fosfato, sendo uma das principais enzimas envolvidas na produção de açúcares para a formação de ácidos nucleicos, importante para a replicação bacteriana. Uma forma eficiente de afetar o local que a proteína atua é por meio do uso de moléculas como os flavonoides, que possuem atividade antiproliferativa e anti-inflamatória que, uma vez interagindo com a transaldolase possam interferir na atividade da mesma.

Assim, a proposta deste trabalho consiste em identificar e quantificar uma possível interação do flavonoide morina com a enzima transaldolase, a fim de verificar quais são as características desta interação. Como a transaldolase produz açúcares para a formação de ácidos nucleicos que são importantes para o processo de replicação da bactéria, um flavonol que possua a função de bloquear essa atividade de replicação e infecção poderia auxiliar no tratamento da linfadenite caseosa e de outras doenças causadas por *C. pseudotuberculosis*.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Realizar a caracterização biofísica da interação entre o flavonoide morina e a enzima transaldolase isolada de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

3.2 - Objetivos Específicos

1. Expressar e purificar a proteína transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis* em linhagem de bactéria *Escherichia coli*;
2. Quantificar a estrutura secundária da transaldolase pela técnica de

Dicroísmo Circular (CD);

3. Verificar a estabilidade térmica da proteína transaldolase por meio de calorimetria diferencial de varredura e comparar com os resultados de Dicroísmo Circular;

4. Analisar se existe interação entre a enzima transaldolase e o flavonoide morina utilizando espectroscopia de Fluorescência;

5. Realizar a caracterização termodinâmica da interação para verificar o tipo de interação do complexo transaldolase-morina;

6. Realizar a modelagem da proteína por método de Bioinformática através do servidor SWIIS-MODEL.

4 - FUNDAMENTOS TEÓRICOS

4.1 – Medidas de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Essa técnica pode ser empregada na obtenção de detalhes estruturais de diferentes tipos de compostos: proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. É um método altamente sensível, capaz de distinguir conformações de α -hélice, folhas- β e alças em proteínas e peptídeos (MANAVALAN; JOHNSON, 1987).

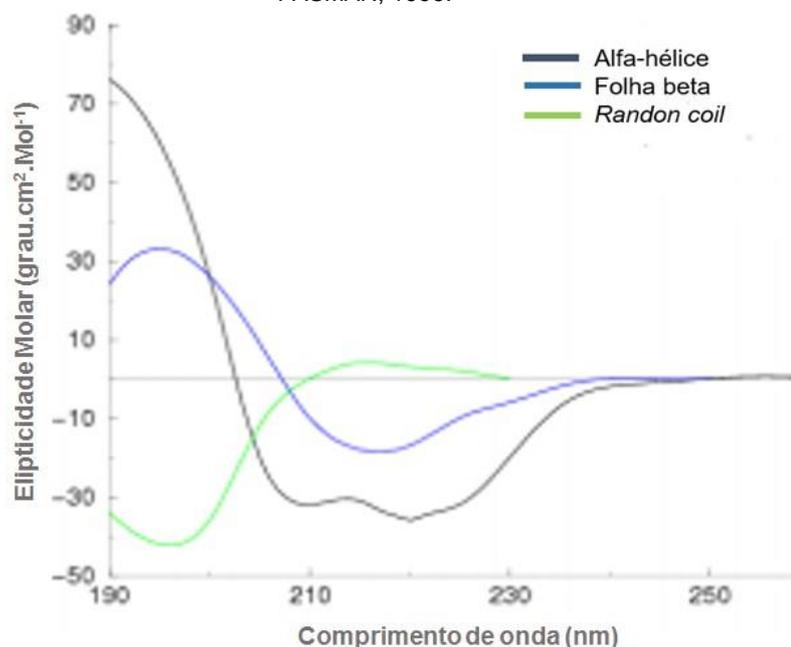
A espectroscopia de luz polarizada ou dicroísmo circular (CD) é um método analítico utilizado para auxiliar a biologia estrutural na determinação da composição de estruturas secundárias de proteínas e peptídeos. A precisão do método varia em função do tipo de estrutura secundária apresentada pela proteína: 97% para hélices, 75% para folhas- β , 50% para voltas e 89% para outros tipos (MANANALAN, JOHNSON, 1987).

A origem dos espectros de proteínas na região do ultravioleta próximo (180 a 250 nm) são predominantemente por transições eletrônicas $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ dos grupos amida, cujos níveis de energia são influenciados pela geometria da cadeia peptídica, sendo os espectros reflexos dos diferentes tipos de estruturas secundárias. Quando uma molécula é opticamente ativa, ela absorve luz circularmente polarizada à direita e à esquerda com intensidades diferentes. Este efeito é denominado Dicroísmo Circular (CD) e se deve à diferença de índices de

refração das duas formas de luz, o que resulta na rotação do plano de polarização da luz (FASMAN, 1996).

O espectro de CD de uma proteína com estrutura em alfa hélice produz uma banda positiva em 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), negativa em 209 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e negativa em 222 nm deslocada para o vermelho (*red shifted*) ($n \rightarrow \pi^*$). No caso da estrutura ser folha beta o espectro de CD apresenta banda negativa em 218 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e positiva em 196 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Para estrutura secundária aleatória ou *Randon coil*, o espectro de CD apresenta banda positiva em 212 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e banda negativa em 195 nm ($n \rightarrow \pi^*$) (Figura 9) (FASMAN, 1996).

Figura 9 - Espectros de Dicroísmo Circular referentes à alfa hélice, folha beta e *randon coil*. Adaptado de FASMAN, 1996.



Os espectros de referência utilizados correspondem aos espectros de proteínas com estruturas puramente compostas de alfa hélice, ou folha beta ou estrutura aleatória que são baseadas em derivados de proteínas de estrutura conhecida (proteínas cujas estruturas cristalinas já foram determinadas). Estas análises foram desenvolvidas através de um grande número de algoritmos empíricos que assumem a independência linear na aditividade dos espectros primários de estruturas secundárias no espectro final da proteína (GREENFIELD e FASMAN, 1969; BRAHMS e BRAHMS, 1980; JOHNSON, 1999; SREERAMA e WOODY, 2000; LEES et al., 2006).

Através da técnica de CD também é possível avaliar a estabilidade térmica de uma dada proteína, analisando-se as mudanças no espectro. Um comprimento de onda frequentemente empregado nesse sentido é 222 nm, incluindo contribuições de α -hélices e folhas- β , sendo que o resfriamento da solução permite observar o grau de reversibilidade da desnaturação de uma dada proteína.

O princípio básico envolvido na análise dos espectros de CD de proteínas é utilizado no cálculo da fração de estruturas secundárias é que o espectro de CD da proteína, θ_λ , pode ser expresso como uma combinação linear de espectros puros de estruturas secundárias (equação 1):

$$\theta_\lambda = \sum f_k \Theta_{k1\lambda} \quad (1)$$

sendo que f_k é a fração de estrutura secundária e $\Theta_{k1\lambda}$ é o espectro padrão da estrutura secundária k. A fração de estruturas secundárias foi calculada utilizando-se o programa de deconvolução espectral CDPPro (SREERAMA & WOODY, 2000). Com estes dados foi possível verificar a integridade da proteína alvo assim como possíveis alterações nas proporções de frações de estruturas secundárias induzidas na formação do complexo da proteína.

Em um processo de desnaturação térmica, assumindo um processo de dois estados $N \leftrightarrow D$, a constante de equilíbrio do processo de desnaturação K_D é dada por (equação 2):

$$\overline{K}_D = \frac{f_D}{f_N} \quad (2)$$

sendo que f_D é a fração de proteína desnaturada e f_N é a fração de proteína no estado nativo, ou seja, $f_N = 1 - f_D$.

Na temperatura de *melting* (T_m) $f_N = f_D$, portanto, $K_D = 1$, logo $\ln(K_D) = 0$. Portanto em um gráfico de $\ln(K_D)$ versus Temperatura, a temperatura de *melting* é obtida quando $\ln(K_D) = 0$.

4.2 – Medidas de Espectroscopia de Fluorescência

Os flavonóides são um modelo útil de substâncias para estudos espectroscópicos de suas interações com proteínas-alvo devido à transferência intramolecular de elétrons em estado excitado e seu comportamento de dupla fluorescência e alta intensidade de fluorescência em solventes pouco polares (GUTZEIT et al., 2005). Tais características permitem a utilização de flavonóides em ensaios espectroscópicos para o estudo das interações destas moléculas com proteínas bacterianas como, por exemplo, a transaldolase.

Supressão faz referência ao processo no qual uma molécula perde sua fluorescência pela presença de um agente, chamado de supressor (VALEUR, 2002). A intensidade de fluorescência de uma macromolécula pode diminuir devido a uma variedade de interações com outros compostos moleculares: rearranjo molecular, transferência de energia, supressão devido a colisões, dentre outros (LAKOWICZ, 1999). Tal decréscimo da fluorescência é denominado supressão ou “*quenching*” e é descrita pela relação de Stern–Volmer, através da seguinte equação (equação 3):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (3)$$

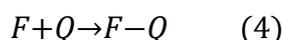
Em que F_0 , F , k_q , K_{SV} , τ_0 e $[Q]$ são, respectivamente, as intensidades de fluorescência antes e após a adição de ligante; a constante de supressão da biomolécula, que reflete a eficiência de supressão ou a acessibilidade dos fluoróforos ao supressor; a constante de Stern–Volmer, que representa a constante dinâmica de supressão; o tempo de vida média de emissão da fluorescência da biomolécula na ausência de ligante (da ordem de $\tau_0 = 10^{-8}$ s) e a concentração de ligante (supressor) (LAKOWICZ, 1999).

4.3 - Mecanismo de supressão estático

Quando for observada relação linear entre a razão de fluorescências F_0/F e a concentração de ligante $[Q]$, é um forte indicador de que a interação entre a

proteína e o ligante é uma ligação estática, não colisional. No caso de ser não estática ou colisional, o gráfico de Stern-Volmer apresentaria uma concavidade positiva.

Na ligação do tipo estática a supressão de fluorescência resulta da formação de um complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. À medida que este complexo absorve luz de excitação, retorna imediatamente para o estado fundamental sem emissão de fóton. A reação de formação do complexo pode ser emitida desta forma (equação 4):



Sendo a constante de associação (K_S) determinada como (equação 5):

$$K_S = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (5)$$

Sendo $[F-Q]$ a concentração do complexo, $[F]$ a concentração do fluoróforo livre, e $[Q]$ a concentração do supressor. Se o complexo não é fluorescente logo a fração da fluorescência remanescente (F/F_0) é igual à fração de fluoróforos não complexados.

$$[F]_0 = [F] + [F-Q] \quad (6)$$

$$[F]_0 = [F] + K_S \cdot [F] \cdot [Q] \quad (7)$$

$$\frac{[F]_0}{[F]} = 1 + K_S \cdot [Q] \quad (8)$$

Visto que a temperatura afeta a formação e estabilidade do complexo, o valor de K_S diminui com relação ao incremento da temperatura (Figura 10). Uma vez que o complexo é não fluorescente e a fluorescência observada só é do fluoróforo não complexado, o tempo de vida (τ) do fluoróforo não complexado segue constante (Figura 10).

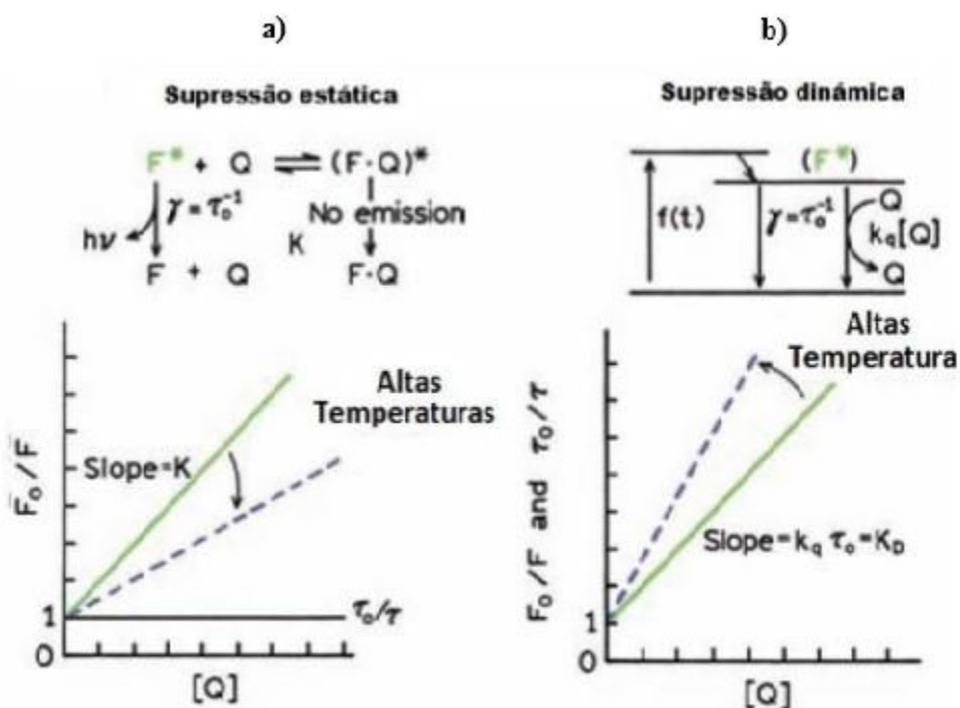
4.3.1 - Mecanismo de supressão dinâmico

A supressão dinâmica (ou colisional) também é descrito pela equação de Stern-Volmer (equação 9):

$$\frac{[F]_0}{[F]} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (9)$$

Sendo F_0 e F as intensidades de fluorescência em ausência e presença do supressor, respectivamente, k_q a constante de supressão bimolecular, τ_0 o tempo de vida do fluoróforo em ausência de supressor, K_D a constante de supressão colisional e $[Q]$ a concentração do supressor. Deve-se identificar que a linearidade do plot de Stern-Volmer (F_0/F versus $[Q]$) não prova que está ocorrendo um evento colisional. É denominado que as altas temperaturas geram uma maior difusão das moléculas e, como resultado, também aumenta os eventos colisionais (Figura 10).

Figura 10 - Mecanismo de supressão estático e dinâmico. a) No mecanismo de supressão estático as altas temperaturas causam uma desestabilização do complexo ocasionando uma diminuição das constantes de supressão, enquanto no b) mecanismo de supressão colisional as altas temperaturas favorecem a difusão das moléculas incrementando, assim, a constante de supressão (LAKOWICZ.,1999).



4.3.2 - Desvio da equação de Stern-Volmer

A análise da supressão da fluorescência é descrita pelo modelo de Stern-Volmer. Eventualmente um desvio da linearidade é observada na supressão da fluorescência, não sendo possível a utilização do modelo de Stern-Volmer. Para tais casos, dois modelos alternativos podem ser testados: modelo de supressão combinado estático-dinâmico e modelo da esfera de ação.

a) Modelo combinado de supressão estático-dinâmico

Este modelo determina que a supressão é motivada pela formação de um complexo e pelos eventos colisionais ao mesmo tempo. Este modelo é de segunda ordem em [Q], o qual origina um desvio da linearidade ocasionado pela combinação de supressão dinâmico e estático ao mesmo tempo (Lakowicz, J.,1999) (equação 10).

$$\frac{[F]_0}{[F]} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot (1 + K_S \cdot [Q]) \quad (10)$$

Sendo F_0 e F são as fluorescências na ausência e presença de supressor, K_D e K_S as constantes de supressão dinâmico e estático e [Q] a concentração de supressor.

b) Modelo da esfera de ação

Esse modelo é uma combinação de supressão estático e dinâmico que requer que o cromóforo e o supressor encontram numa certa distância um ao outro, chamado esfera de ação (Laws, W. e Contino, P.,1992) (equação 11)

$$\frac{[F]_0}{[F]} = (1 + K_D \cdot [Q]) \cdot e^{(K_S \cdot [Q])} \quad (11)$$

Sendo F_0 e F são as fluorescências na ausência e presença de supressor, K_D e K_S as constantes de supressão dinâmico e estático e [Q] a concentração de supressor.

4.4 - Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Os três parâmetros termodinâmicos de maior interesse são a energia livre de Gibbs, entalpia e entropia. Quando ocorre uma reação química, o calor liberado ou absorvido corresponde à diferença de entalpia entre produtos e reagentes. Essa diferença corresponde à variação da entropia da reação. A mudança na energia livre de Gibbs (ΔG) na reação está relacionada com as alterações na entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) (ALLEWELL et al., 2013).

As forças que atuam entre pequenos ligantes e uma macromolécula biológica incluem interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações eletrostáticas. Parâmetros termodinâmicos são importantes para verificar as interações atuantes não covalentes. Pode-se resumir as leis termodinâmicas para determinar os tipos de forças que estão atuando sobre uma interação. Se $\Delta H > 0$ e $\Delta S > 0$, interações hidrofóbicas desempenham o papel principal na reação de ligação, se $\Delta H < 0$ e $\Delta S > 0$, o efeito eletrostático é dominante, se $\Delta H < 0$ e $\Delta S < 0$, as forças principais que estão atuando na interação são Van der Waals e pontes de hidrogênio (TENG et al., 2011). A variação de entalpia (ΔH), variação de energia livre (ΔG) e a variação de entropia (ΔS) para a interação entre Transaldolase e Morina foram calculadas com base na equação de Van't Hoff (equação 12):

$$\ln \frac{(K_{b2})}{(K_{b1})} = \frac{(1}{T_2} - \frac{1}{T_1}) (\Delta H)}{(R)} \quad (12)$$

Sendo que K_{b1} e K_{b2} são os valores das constantes de ligação às temperaturas T_1 e T_2 e R é a constante universal dos gases. Esta equação é a base do gráfico de Van't Hoff, o qual compara a variação do inverso da temperatura (T) em Kelvin com o logaritmo neperiano das constantes de associação (K_b) e o coeficiente angular da reta originada proporciona a variação da entalpia (ΔH) da reação.

A energia livre de Gibbs é obtida por meio da equação descrita abaixo para cada temperatura, levando-se em consideração os valores das constantes de associação (K_b) (equação 13).

$$\Delta G = -RT \ln(K_b) \quad (13)$$

Sendo que ΔG é a variação da energia livre de Gibbs, R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura em Kelvin e K_b a constante de associação.

Obtidos os valores de ΔH e ΔG , utiliza-se a equação abaixo para a obtenção dos valores da variação da entropia (ΔS) para as reações em cada temperatura (equação 14):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (14)$$

4.5 - Análise por Bioinformática

No presente estudo, foi realizada uma busca de sequências de transaldolases de espécies bacterianas, incluindo a proteína Transaldolase de *C. pseudotuberculosis* e acrescentou também de espécie humana, através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para encontrar existência de homologia. As sequências de aminoácidos selecionadas para efetuar as análises comparativas representam a sequência total da proteína, expressas por espécies bacterianas e humana com estruturas já conhecidas, usando o banco de dados PDB como: *Bacillus subtilis*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga marítima*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium glutamicum*, *Homo sapiens*. A sequência da proteína da espécie *Homo sapiens* não aparecia nos resultados de homologia pelo BLAST, então sua sequência foi inserida para realizar o alinhamento.

O alinhamento foi necessário para analisar a conservação das sequências da proteína e a pesquisa pelo BLAST para optar pelo melhor método de modelagem da proteína em estudo. Em seguida, baseados nos resultados dos alinhamentos, foi definido o grau de conservação com identidade mínima ou máxima entre os resíduos, através do servidor Clustal Omega - *Multiple*

Sequence Alignment, apresentado como porcentagem de ocorrência notado durante as análises de bioinformática.

Para a construção do modelo da proteína *C. pseudotuberculosis* foi utilizado o servidor SWISS-MODEL, método que gera modelos de estrutura de proteínas tridimensionais tendo por objetivo encaixar a sequência alvo de uma proteína de estrutura não conhecida a uma estrutura molde com estrutura já conhecida. Neste trabalho, a estrutura da *Corynebacterium glutamicum* foi o modelo utilizado como molde.

5 – MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Transformação em célula competente (*Escherichia coli* - TOP 10)

O vetor recombinante *PD441Trans* foi transformado em *Escherichia coli* linhagem TOP 10, utilizando-se 50 µL de células competentes e 200 ng do plasmídeo. Essa mistura permaneceu em gelo por 30 minutos e, então, foi submetido a um choque térmico por 30 segundos a 42 °C e 2 minutos em gelo. Em seguida adicionou-se 300 µL de meio de cultura líquido (LB) e as bactérias foram submetidas à regeneração (1 hora a 37 °C com agitação à 100 rpm). Em seguida, 8 µL da cultura foi plaqueada em meio LB sólido contendo canamicina (50 µg/mL). As placas foram incubadas 37 °C *overnight*.

5.2 - Purificação do plasmídeo para propagação

O DNA plasmidial foi purificado utilizando-se o “QIAprep® Spin Miniprep Kit”, seguindo-se as orientações do fabricante (Qiagen). O DNA plasmidial foi eluído em 50 µL de tampão 10 mM Tris, pH 8.5.

5.3 - Transformação em *E. coli* linhagem BL21 RIL

Plasmídeos recombinantes contendo as sequências de interesse foram transformados em linhagem BL21-RIL de *E. coli* competente, essa linhagem

possui cópias extras de genes de tRNA de argU, ileY, leuW. Esses genes codificam tRNAs que identificam códons para arginina (AGA e AGG), isoleucina (AUA) e para leucina (CUA), respectivamente. Essa linhagem tem tRNAs que sempre restringem a tradução heteróloga de proteínas de organismos que possuem genomas ricos em AT, e possibilitam alto nível de expressão de proteínas que são fracamente expressas em linhagens convencionais de BL21. Utilizou-se 50 µl de células competentes e 3 µl (200 ng) de amostra de plasmídeo. Essa mistura permaneceu no gelo durante 30 minutos e, então, foi submetida ao choque térmico a 42 °C por 1 min e 2 min no gelo. Em seguida foram adicionados 300 µl de meio líquido (LB), sendo as bactérias submetidas à regeneração (1 h a 37 °C com agitação a 100 rpm). Em seguida, as bactérias foram plaqueadas em meio sólido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol, 50 e 34 µg/mL, respectivamente) e incubadas a 37 °C durante a noite para rastreamento de colônias. Foi selecionada uma única colônia bacteriana para a preparação do pré-inóculo para o teste de expressão.

5.4 - Teste de expressão da proteína Transaldolase

Inicialmente, 700 µl do pré inóculo foi transferido para cada novo tubo contendo 5 mL de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol, 50 e 34 µg/mL). Os tubos foram mantidos sob agitação a 35 °C até atingirem a OD (densidade óptica) de 0,5. A OD foi determinada através da leitura da amostra em espectrofotômetro a 540 nm. A indução da expressão foi feita com a concentração de 0,3 mM de IPTG a 30 °C. Foram coletadas amostras antes da indução, após, 2 horas, 6 horas e 16 horas da indução.

As alíquotas coletadas foram centrifugadas a 8.000 xg por 1 minuto, sendo o sobrenadante descartado. O pellet foi eluído em 50 µL de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 60 mM; glicerol 25 %; SDS 2 %; mercaptoetanol 14,4 mM; azul de Bromofenol 1 %). As amostras eluídas foram submetidas a uma temperatura de 96 °C por 10 minutos em termomixer (misturador para preparação de amostras) para garantir uma desnaturação proteica completa. Em seguida foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % para visualização da banda de proteína de interesse.

Após verificação da expressão nos testes iniciais, a expressão foi realizada em maior escala, visando a obtenção de maiores quantidades de proteínas para purificação. Inicialmente, 10 mL de pré inóculo foram transferidos para um novo frasco contendo 1 litro de meio líquido seletivo (LB + canamicina e cloranfenicol 50 e 34 µg/mL, respectivamente). A cultura foi mantida sob agitação e aeração a 35 °C até atingir a OD₅₄₀ em 0,5, determinada por leitura da amostra em espectrofotômetro. A indução da expressão foi feita com 0,3mM de IPTG por 6 horas a 30 °C. Em seguida, o meio foi centrifugado por 20 min a 8.000 xg a 4 °C. O “pellet” foi ressuscitado em 30 mL de tampão de lise (50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 0,5 mM de 2-Mercaptanol, 5 mM de imidazol) pH 8,5 e 1 mg/ml de lisozima. A solução foi incubada por 10 minutos em gelo, e em seguida submetida a 10 pulsos de 15 segundos em sonicador com intervalos de 10 segundos para lise celular. Esta amostra foi centrifugada por 1 hora a 54.000 xg a 4 °C e, em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 µm. Após a centrifugação, a amostra foi submetida à purificação para obtenção da proteína de interesse.

5.5 - Purificação da proteína Transaldolase por cromatografia de afinidade (Ni-NTA)

Na construção da enzima transaldolase de *C. pseudotuberculosis*, o gene que codifica a enzima é precedido por uma sequência codificadora que permite a expressão da proteína fusionada a uma cauda de histidina (6x His) na região Nterminal. A presença dessa cauda confere à proteína alta afinidade de ligação em resinas cromatográficas com íons de metal quelados, no caso o utilizado foi o Ni²⁺ (His60 Ni Resin Clontech®). O composto químico imidazol (composto heterocíclico contendo dois nitrogênios com pKa = 7.0 e pKa = 14.9) foi utilizado para realizar a eluição da proteína que se liga à resina contendo os íons Ni²⁺, já que o anel imidazólico apresenta maior afinidade química para a ligação a esses íons em pH 8,0, podendo competir com os resíduos de histidina pela ligação. O procedimento de purificação teve início com o empacotamento de 3 mL de resina carregada com níquel e a exaustiva lavagem com água deionizada, seguida do equilíbrio da resina com 10 volumes (no caso 40 mL) de tampão (50 mM NaH₂PO₄

pH 8,0; 300 mM NaCl; 0,5mM 2-Mercaptanol; 5 mM imidazol). A fração solúvel proveniente da lise celular de 1 L de cultura bacteriana descrito na seção anterior (seção 5.5) foi incubada com a resina equilibrada, durante uma hora a 4 °C. A amostra foi eluída com tampões contendo concentrações crescentes de imidazol 10 – 600 mM.

Alíquotas de 50 µL de cada etapa da purificação foram acrescidas de 10 µL de tampão de amostra 5X (Tris-HCl pH 6,8 60 mM; glicerol 25 %; SDS 2 %; 2-mercaptoetanol,14,4 mM; azul de Bromofenol 1%) e submetidas à uma temperatura de 96 °C por 10 minutos em termomixer (misturador para preparação de amostras) para assegurar uma desnaturação proteica completa. Em seguida foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % para visualização das bandas de proteínas obtidas durante o processo de purificação. Após a visualização das bandas obtidas pela purificação as amostras no qual a proteína de interesse foi visualizada passaram por um concentrador (Amicon®) 10 kDa e foram concentradas até atingirem 1 ml para a realização de uma segunda purificação executada em cromatógrafo AKTA *purifier* em cromatografia de exclusão molecular.

5.6- Purificação da proteína Transaldolase por cromatografia de exclusão molecular através do sistema AKTA *purifier*

A cromatografia de exclusão molecular ou filtração em gel baseia-se nas propriedades de peneiramento de matrizes porosas e inertes através das quais as macromoléculas se movem. As matrizes são identificadas de tal forma que as moléculas pequenas são atrasadas na coluna. Para a purificação da enzima transaldolase foi utilizada uma coluna *Superdex 200 GL (GE)* acoplada ao sistema de cromatografia *AKTA Explorer 10 (GEHealthcare)*. A coluna foi equilibrada com tampão NaF 50 mM e NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,5. As frações recuperadas da coluna que continham a proteína foram recolhidas para análise posterior através de eletroforese em gel de poliacrilamida 15 %.

5.7 - Determinação da Concentração da Proteína

Para determinação da concentração de proteína foi utilizado o espectrofotômetro Cary-3E (Varian, Palo Alto, CA). A concentração foi determinada usando-se medida de absorbância da amostra em 280 nm e usado o coeficiente de extinção molar de $36.900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinado pela plataforma Expasy-ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). O cálculo da concentração foi feita utilizando-se a lei de Beer – Lambert (equação 15):

$$Abs = C \cdot l \quad (15)$$

em que *Abs* = absorbância da amostra em 280 nm; *C* = Concentração da amostra; *l* = caminho óptico (distância em cm da cubeta); ϵ = coeficiente de extinção molar em 280 nm, sabendo-se que:

$$\epsilon_{280}(\text{Prot}) = N(\text{Tyr}) * \epsilon_{280}(\text{Tyr}) + N(\text{Trp}) * \epsilon_{280}(\text{Trp}) + N(\text{Cys}) * \epsilon_{280}(\text{Cys})$$

onde (para proteínas em água medidas em 280 nm): $\epsilon_{280}(\text{Tyr}) = 1490 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, $\epsilon_{280}(\text{Trp}) = 5500 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$, $\epsilon_{280}(\text{Cys}) = 125 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

5.8 - Preparo das soluções de proteína e flavonoide

A amostra de proteína purificada foi mantida em tampão 50 mM NaH_2PO_4 e 50 mM NaF pH=8,5 e em gelo paralelamente as soluções estoque do flavonoide Morina (MM = 302,24 Da) foram preparadas em DMSO. Para determinação da concentração da solução estoque da Morina foi usado o coeficiente de extinção molar de $\epsilon_{344} = 5.967 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 344 nm, determinado experimentalmente.

5.9– Medidas de Espectroscopia de Dicroísmo Circular

De posse da proteína pura, as medidas de CD foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J-815, a temperatura ambiente, em cubeta de 0,5 cm

de caminho óptico. O espectro entre 190 e 260 nm foi acumulado a uma velocidade de 20 nm/min, com resposta de 2 s e abertura de fenda de 1,0 nm, realizando-se 10 acumulações.

As medidas de desnaturação térmica foram realizadas em espectropolarímetro Jasco J-815 acoplado a um sistema Peltier, no intervalo de temperatura de 20 a 80 °C, com velocidade de aquecimento de 1 °C/min e leituras a cada 0,5 °C. Foi utilizada cubeta de 0,5 cm de caminho óptico, com leitura em 222 nm, realizando-se 10 acumulações.

5.10 – Medidas de Espectroscopia de Fluorescência

As medidas de fluorescência foram realizadas em espectrofluorímetro Cary Eclipse, Varian® utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, em temperaturas de 25, 30 e 37 °C. A abertura das fendas de excitação e de emissão foi ajustada em 5 nm, com excitação em 290 nm e emissão entre 300 e 500 nm. As medidas da interação da proteína com os flavonoides foram feitas coletando-se os espectros de fluorescência da proteína e acompanhando a diminuição (supressão) da intensidade dos mesmos após a adição de pequenas alíquotas da solução estoque de ligante (Morina) na solução.

5.11 - Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) fundamenta-se no princípio da medição da absorção e liberação de calor de uma dada amostra. A DSC para a proteína Transaldolase foi realizada em N-DSC III (TA Instruments, EUA) no intervalo de temperaturas de 20 °C a 80 °C com taxa de aquecimento de 1 °C/min. A concentração de proteína para esse experimento foi de 23 µM em tampão fosfato de sódio de 20 mM em pH 8,0 contendo 100 mM de NaF. As células calorimétricas (célula de referência e de amostra) foram carregadas com o tampão apropriado e equilibradas a 20 °C durante 10 min. A varredura do tampão foi repetida dez vezes para assegurar uma linha de base estável. A amostra de proteína foi colocada na célula de amostra e aquecida no intervalo

de temperatura mencionado acima. O gráfico da capacidade de calor *versus* temperatura foi determinado subtraindo a linha de base ou varredura "tampão vs tampão" á partir do experimento "proteína vs tampão".

6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Caracterização da Proteína Transaldolase por meio do programa Expasy- ProtParam

Utilizando-se a sequência nucleotídica do gene da transaldolase (quadro abaixo), o programa ProtParam (GASTEIGER et al., 2005) forneceu dados inerentes à proteína transaldolase produzida após a otimização de códons do gene. A proteína transaldolase de *C. pseudotuberculosis* apresenta 375 aminoácidos e massa molecular de aproximadamente 40 kDa. O ponto isoelétrico teórico é 4,5 (esse foi utilizado para a escolha do pH dos tampões para purificação e titulações), coeficiente de extinção molar $\epsilon_{280}=36.900\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ (usado para calcular a concentração da proteína). A Tabela 1 traz os dados obtidos através da plataforma Expasy-ProtParam:

MNAIDALAQAGTSTWLDDLSRERITSGNLSELITTKSIVGVTTNPAIFAAAMSKG
TAYDSQIADLKAHAVGVDEAVYAMSIQDVQQACDIFADVVKSSHGADGRVSIE
VDPRISDDREATLAQARELWKQVDRPNVMIKIPATAGSLPAIADALAEGISVNV
TLIFSVARYREVIAAYMEGINRAADNGLDVSTIYSVASFFVSRLDSEVDKRLEAI
GTDEALALRGKAGVANARRAYAVFKELFSASELPENANIQRPLWASTGVKNP
DYSPTLYVTELAGPDTVNTMPEATIDAVLGSNDNVSDALTDTAEEAEETFSAIS
QAGIDFEDVFAVLEQEGVDFVAAWNELLDSMQARLSGGENLYFQGHHHH

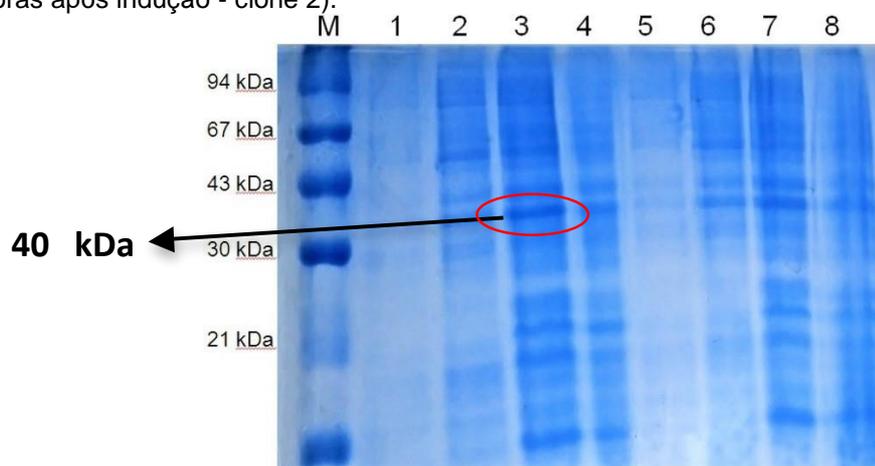
Tabela 1 – Características da proteína transaldolase geradas pelo programa ProtParam

Número de aminoácidos	375
Massa Molecular	40 kDa
PI teórico	4,5
Coefficiente de Extinção Molar	36.900 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$

6.2 - Expressão da Proteína Transaldolase

Foram coletadas alíquotas antes e após a expressão da proteína transaldolase (para dois clones diferentes) a fim de confirmar a presença da mesma no meio de cultivo, a confirmação visualizada a partir do *SDS-PAGE* (15% de poliacrilamida) corado com *Comassie Brilliant Blue* (Figura 11).

Figura 11- SDS-PAGE 15% corado com *Comassie* referente ao teste de expressão da proteína Transaldolase. Coluna 1: M (Marcador de peso molecular), Coluna 2: (Amostra antes da indução – clone 1), Coluna 3: (2 horas após indução – clone 1), Coluna 4: (6 horas após indução – clone 1), Coluna 5: (16 horas após indução – clone 1), Coluna 6: (Amostra antes da indução - clone 2), Coluna 7: (2 horas após indução - clone 2), Coluna 8: (6 horas após indução - clone 2), Coluna 9: (16 horas após indução - clone 2).



No gel desnaturante da Figura 11, pode-se verificar que há a expressão basal de proteínas bacterianas (colunas com marcação 1 e 5) antes da indução. Após indução, pode-se perceber que houve um significativo aumento da expressão da proteína de interesse na banda em torno de 40 kDa (seta), corroborando com os valores apresentados pelo ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>), partindo-se, então, para os processos subsequentes de purificação.

A proteína de interesse foi expressa utilizando-se as seguintes condições: 0,3mM de IPTG, seis horas após a indução, à 30°C. Na coluna com marcação 4, dezesseis horas após indução, observa-se também a proteína expressa. Para otimizar tempo e custo, como melhor condição de expressão foi definido seis horas.

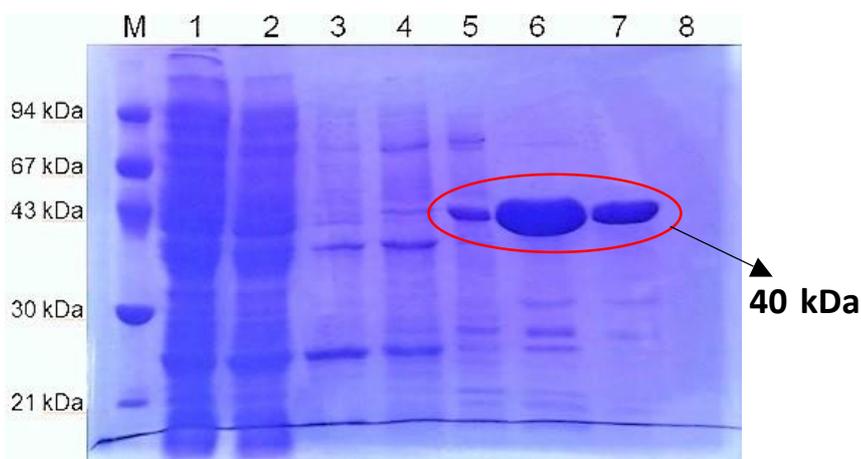
6.3 - Purificação da Proteína Transaldolase

Decorrido o tempo de expressão da proteína transaldolase, as células bacterianas, contendo a proteína de interesse, foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de lise e lisadas, conforme metodologia descrita na seção 5.4. Após o processo de sonicação, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante recolhido, seguindo para os processos subsequentes de purificação.

6.3.1 – Cromatografia de afinidade

A primeira etapa de purificação consistiu em uma cromatografia de afinidade, conforme descrito no item 5.6, sendo que o sobrenadante foi passado em resina His60 Ni Resin (Clontech®). Para equilíbrio da coluna utilizou-se o tampão de lise (50 mM de NaH_2PO_4 ; 300 mM de NaCl; 0,5 mM 2Mercaptanol e 5 mM de imidazol pH 8,5). As frações ligadas foram lavadas e eluídas com tampão de lise contendo concentrações crescentes de imidazol (10 – 600 mM). A Figura 12 apresenta o gel desnaturante contendo as alíquotas resultantes desse primeiro processo de purificação para a proteína transaldolase.

Figura 12 - SDS-PAGE - Cromatografia de afinidade com His60 Ni para a proteína Transaldolase. Coluna 1: (Marcador de peso molecular), Coluna 2: (Sobrenadante), Coluna 3: (Tampão de lise com 5 mM de Imidazol), Coluna 4: (Lavagem com 10 mM de imidazol), Coluna 5: (Lavagem com 20 mM de imidazol), Coluna 6: (Eluição com 40 mM de imidazol), Coluna 7: (Eluição com 100 mM de imidazol), Coluna 8: (Eluição com 400 mM de imidazol); Coluna 9: (Lavagem com 600 mM de Imidazol).



As frações eluídas (com 40, 100 e 400 mM de imidazol – Figura 12, colunas com marcação 5, 6 e 7, respectivamente), contendo a proteína de interesse, ainda apresentam alguns contaminantes característicos da expressão. Entretanto, a maior parte dos contaminantes, que antes pertencia ao extrato bruto, foi eliminada nessa técnica. A partir dessas amostras eluídas partiu-se para os processos subsequentes de purificação.

6.3.2 – Cromatografia por Exclusão Molecular

A proteína de interesse, após passagem pela cromatografia de afinidade, foi submetida a uma cromatografia por exclusão molecular, conforme descrito na seção 5.7. A coluna foi equilibrada com o tampão contendo 50 mM de NaF e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8,5. A amostra foi aplicada com um fluxo constante de 0,3 mL/min. O cromatograma apresentou uma banda de absorção máxima no UV:58 nm (Figura 13), e, nesta etapa, alíquotas de 1 ml foram coletadas. As amostras coletadas na etapa de purificação por exclusão molecular foram avaliadas por SDS-PAGE a 15%, verificando-se que, nesta etapa, foram obtidas frações com grau de pureza superior a 90% (Figura 14)

Figura 13 - Cromatograma ilustrando padrão de eluição da proteína transaldolase utilizando-se cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 GL 10/30 pré-empacotada acoplada ao equipamento AKTA *purifier* (sistema automatizado). A coluna foi previamente equilibrada com tampão contendo 50 Mm de NaF e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8,5. O cromatograma apresentou uma banda de absorção máxima no UV:58 nm

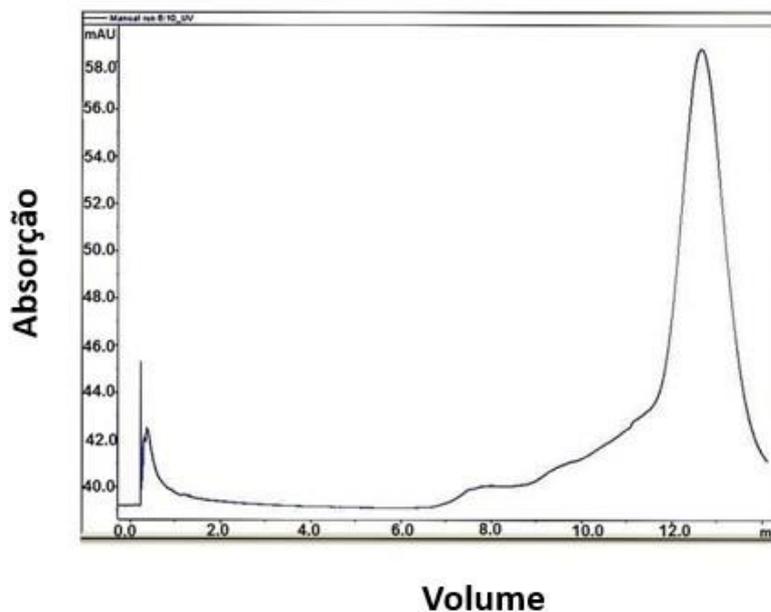
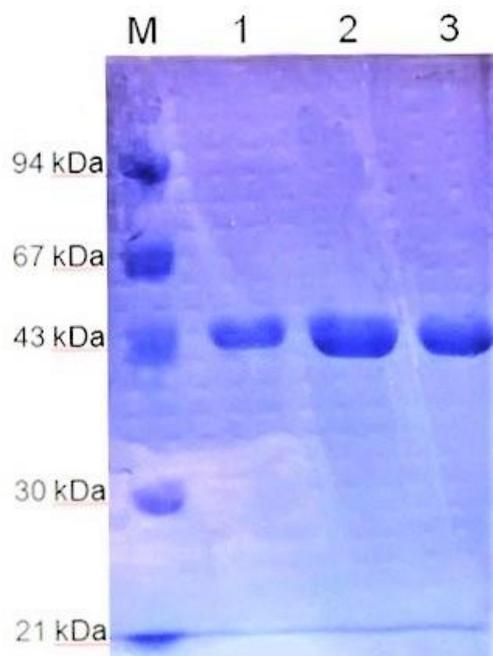


Figura 14 - SDS-PAGE 15% corado com *Comassie* referente a purificação da proteína transaldolase utilizando-se cromatografia de gel filtração em sistema AKTA *purifier*. Coluna 1: (Marcador de peso molecular); Coluna 2:(Amostra 1 referente ao pico de 58 nm da Exclusão Molecular); Coluna 3: (Amostra 2 referente ao pico de 58 nm da Exclusão Molecular); Coluna 4: (Amostra 3 referente ao pico de 58 nm da Exclusão Molecular).



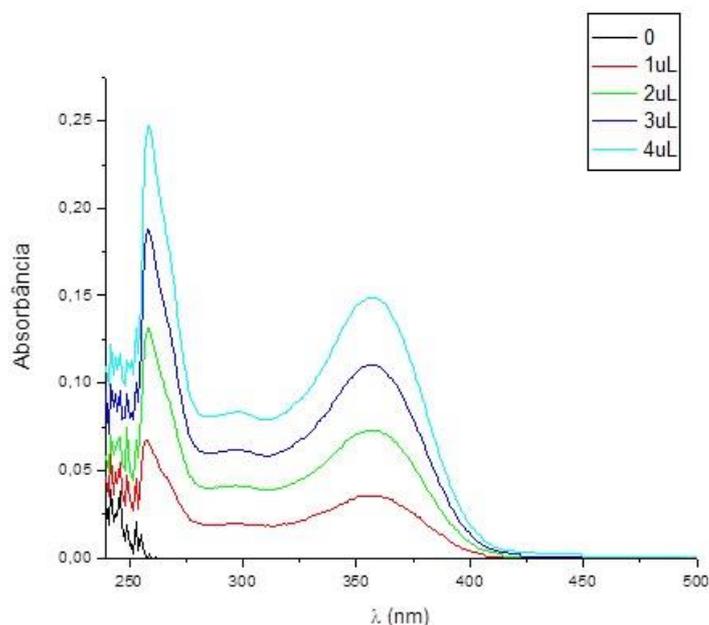
De posse da proteína pura, foi possível realizar os experimentos de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência a fim de caracterizar a enzima transaldolase de *C. pseudotuberculosis*.

6.4 – Interação entre a proteína transaldolase e o flavonoide morina por análises espectroscópicas

6.4.1 – Espectroscopia de absorção UV-Vis

O espectro de absorção do flavonoide morina está demonstrado na Figura 15, apresentando dois picos de absorção característicos, um por volta do comprimento de onda de 260 nm e outro próximo de 360 nm. Essas características são importantes para o cálculo das concentrações das soluções utilizadas nos experimentos. A concentração dos estoques das soluções utilizadas foram: [transaldolase] = 3 μ M e [320 μ M] .

Figura 15- Espectro de absorção de UV-Vis do flavonoide morina, mostrando a absorbância pelo comprimento de onda. A morina foi diluída e titulada em DMSO. Caminho óptico de 1 cm, [320 μ M].

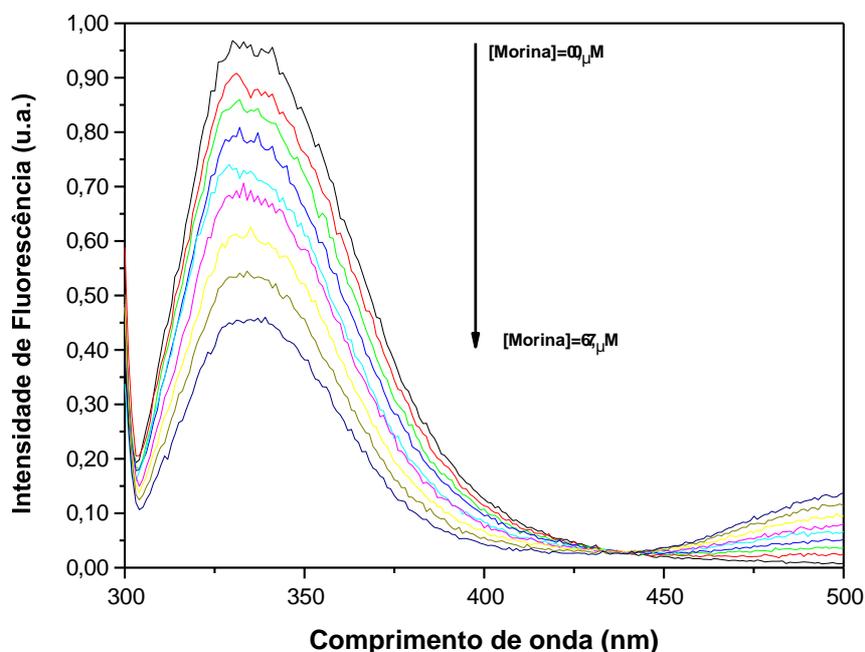


6.4.2 – Titulações Espectrofluorimétricas

No experimento de supressão de fluorescência da Transaldolase pela Morina, a concentração da proteína foi mantida constante em 3 μ M e o flavonoide foi titulado à solução de Transaldolase (50 mM de NaF e 50 mM de NaH₂PO₄, pH

8,5). A concentração de Morina variou de 0 a $6,7\mu\text{M}$ em cada titulação. O experimento foi realizado em 298, 303 e 310 K. A solução de Transaldolase foi excitada em 290 nm, já que esse comprimento de onda excita unicamente resíduos de triptofano apresentados pela proteína Transaldolase (LAKOWICZ,1999). A emissão de fluorescência da Transaldolase na presença e na ausência do flavonoide foi registrada de 300 a 500nm. O efeito do flavonoide sob a intensidade de fluorescência da Transaldolase em 298 K é mostrada na Figura 16.

Figura 16 - Espectro de emissão de fluorescência do sistema transaldolase-morina ($T= 298\text{ K}$, $\lambda_{\text{exc}} = 290\text{nm}$, Concentração de transaldolase = $3\mu\text{M}$) em tampão 50 mM de NaF e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8,5. Verifica-se a supressão da fluorescência com o aumento da concentração de Morina na solução de proteína (indicada pela seta). Os espectros correspondentes à 303 e 310K apresentaram o mesmo perfil.



Na Figura 16 pode-se visualizar o decréscimo do espectro de fluorescência. Também é possível observar que não há deslocamento do pico de fluorescência da proteína quando acrescida de ligantes, indicando que não há contribuição da fluorescência dos anéis aromáticos do flavonoide neste comprimento de onda. A supressão de fluorescência é um indicativo de que o ambiente proteico está sendo perturbado. Este efeito indica interação entre o

ligante e a molécula proteica, porém não permite ainda caracterizar o tipo de interação.

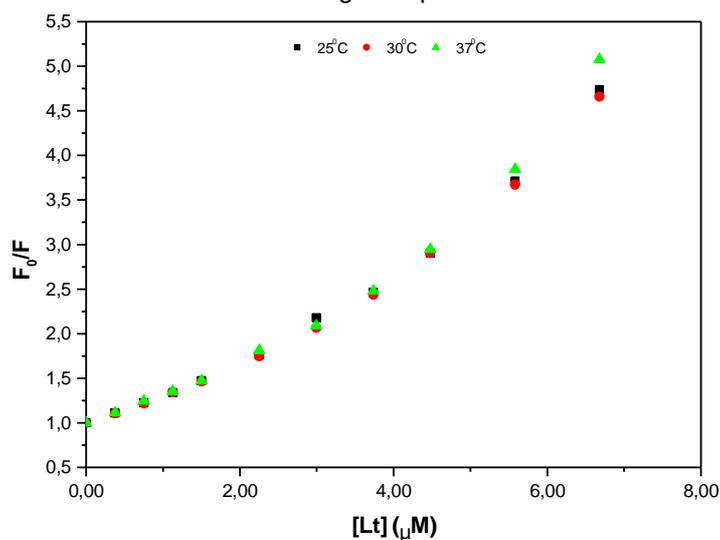
O processo de supressão de fluorescência pode acontecer com a presença de uma molécula supressora. Muitas interações moleculares podem ocasionar-se em um processo de supressão, tais como, reações com estado excitado, rearranjo molecular, transferência de energia, formação de complexo de estado fundamental e processo colisional. Esses mecanismos são classificados como dinâmico ou estático e, podem se diferenciar por suas dependências com a temperatura, viscosidade e/ou tempo de vida de fluorescência (LAKOWICZ,1999).

Primeiramente foram analisadas as variações de fluorescência da transaldolase com o acréscimo de ligante na solução, de forma a se obter uma faixa de variação da razão Ligante/Proteína com valores inferiores até valores bem superiores à unidade de emissão da proteína, permitindo garantir que no experimento realizado foi atingida a região de saturação.

Nos experimentos realizado, embora o flavonoide tenha sido preparado em DMSO, o volume total de álcool na solução contendo a proteína e o ligante, após as titulações, não ultrapassou 2,7 % do volume total da solução, não afetando, desta forma, a estrutura terciária da proteína, uma vez que concentrações acima de 10 % desse solvente são necessárias para causar discretas alterações na estrutura proteica (TABOADA et al., 2007).

Para verificar o tipo de supressão e, portanto, o tipo de interação existente entre a transaldolase e o flavonoide morina, os dados experimentais foram analisados para determinar a relação entre a variação da razão das fluorescências do estado livre com o ligado em função do acréscimo de ligante, gráfico F_0/F versus $[L]$, o qual nos fornece o valor da constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Na Figura 17 é apresentado o gráfico de Stern-Volmer referente ao experimentos realizados e na Tabela 2 os valores de K_{sv} obtidos por meio da declividade do gráfico. O software Origin 8.5.1 foi utilizado para a construção dos gráficos, bem como o cálculo do melhor ajuste linear para cada gráfico.

Figura 17 - Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da Transaldolase pela Morina em 298, 303 e 310 K. O coeficiente angular apresenta o valor de K_{sv} .



A Figura 17 mostra que, dentro da variação de concentração de flavonoide estudada, os resultados de supressão de fluorescência em 298, 303 e 310 K estão de acordo com a equação de Stern-Volmer.

Tabela 2 - Valores de K_{sv} obtidos na interação realizada entre a proteína Transaldolase e o flavonoide Morina para diferentes temperaturas.

Temperatura (K)	$K_{sv} \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
298	5,22
303	5,48
310	5,30

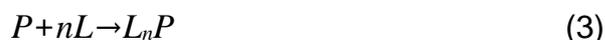
* K_{sv} : Constante de Stern-Volmer

Nos resultados mostrados na Figura 17, a linearidade observada entre F_0/F e $[L]$, e os valores das constantes de Stern-Volmer para as interações entre o flavonóide e a proteína transaldolase indicam interação entre a proteína e o ligante. No caso da transaldolase este tipo de interação tem uma importância na proposta de bloquear a síntese de ácidos nucleicos necessários à replicação da bactéria. O resultado na Tabela 2 exhibe os valores para as constantes de supressão de Stern-Volmer K_{sv} em 298, 303 e 310 K, que são obtidas a partir do ajuste linear aos dados experimentais. A Tabela 2 mostra que os valores de K_{sv} são inversamente correlacionados com o aumento da temperatura, indicando que o mecanismo de supressão da Transaldolase pelo flavonoide é iniciado pela formação do complexo Transaldolase-flavonoide, ou seja, indicando a ocorrência

do mecanismo de supressão combinado estáticodinâmico, ou seja, a supressão é influenciada pela formação de um complexo e pelos eventos colisionais ao mesmo tempo, gerando um desvio de linearidade.

6.4.3 - Cálculo dos parâmetros de interação

No caso do mecanismo de supressão estática, onde o ligante ligado suprime totalmente a fluorescência da proteína, a suposição adotada é que os sítios de ligação na proteína são iguais e independentes. Este modelo permite escrever a equação de equilíbrio de reação como:



em que [P] é a concentração de proteína, n é o número de sítios de ligação do ligante na proteína, [L] é a concentração de ligante e [L_nP] é a concentração de complexo Proteína-ligante com constante de ligação K_b, dada por:

$$K_b = \frac{[L_nP]}{[L]^n [P]} \quad (4)$$

Assumindo um modelo de dois estados no qual a proteína na solução encontra-se complexada com o ligante ou livre, ou seja, [P_t] = [L_nP] + [P_f], onde [P_f] é a concentração de proteína não complexada com ligante ou proteína livre. Nos processos de supressão estática, a fluorescência F do sistema é diretamente proporcional à concentração de proteína livre [L_f], assumindo que o complexo proteína-ligante [L_nP] é não fluorescente, de tal forma a razão entre a intensidade de fluorescência da solução que contém proteína livre (sem a presença de ligante) F₀ e a intensidade de fluorescência após a adição de ligante na solução F é igual à razão entre a concentração de proteína livre e proteína ligada:

Fazendo [P_b] = [L_nP], temos:

$$\frac{[P_t]}{[L_nP]} = \frac{F_0}{F} \quad (5)$$

$$[P_t] = [P_b] + [P_f] \quad (6)$$

Substituindo as equações (5) e (6) em (4), temos:

$$K_b = \frac{[P_t] - [P_f]}{[L_n]^n [P_f]} = \frac{[P_t] - [P_f]}{[P_f] [L_n]^n}$$

onde

$$\frac{[P_t] - [P_f]}{[P_f]} = \frac{F_0 - F}{F}$$

Portanto:

$$\frac{F_0 - F}{F} = K_b [L_f]^n \quad (7)$$

Admitindo que a concentração de ligante na solução seja maior que a concentração de proteína, portanto $[L_t] \cong [L_f] = [L]$, pode-se então relacionar a fração de fluorescência com a concentração de ligantes através da seguinte relação:

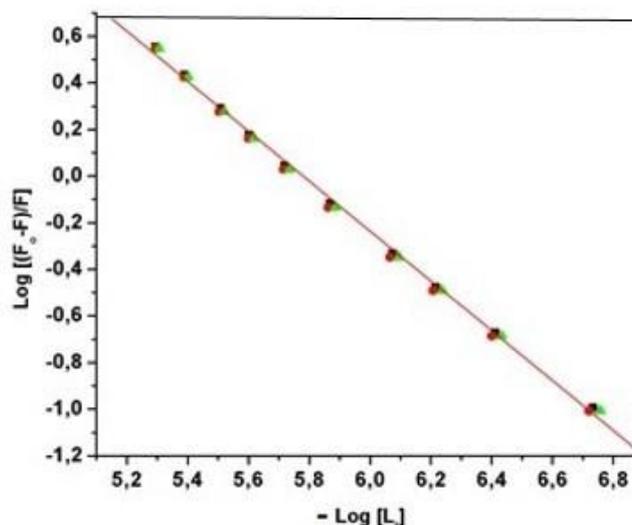
$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log(K_b) + n \log([L]) \quad (8)$$

onde, F_0 e F são as fluorescências antes e após a adição de ligante $[L]$

Através do gráfico $\log[(F_0 - F)/F]$ versus $\log([L])$, onde se observa dependência linear, pode-se obter os valores relativos ao número n de sítios de ligação da proteína e a constante de associação K_b relativa à interação dos ligantes com as proteínas.

Nos resultados do gráfico $\log[(F_0 - F)/F]$ vs $\log([L])$ (Figura 18) gerados pelo software Origin 8.5.1, pode-se obter os valores relativos ao número de ligante por proteína (n) e a constante de associação aparente K_b da interação do ligante Morina com a proteína Transaldolase. A figura 18 apresenta o resultado referente à titulação da proteína com o ligante, sendo que o valor de K_b e n da interação são apresentados na Tabela 3.

Figura 18 - Gráfico duplo-log para a supressão de fluorescência da Transaldolase ($\lambda_{ex} = 290$ nm) pela Morina em 298, 303 e 310 K. [Transaldolase] = 3 μ M em tampão 50 mM de NaF e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8,5.



O valor da constante de ligação K_b , referente à interação da proteína transaldolase com o flavonoide morina (Figura 18) indica uma interação moderada. É consenso na literatura considerar a seguinte classificação: constantes abaixo da ordem de 10^4 como interações de afinidade fraca, 10^4 a 10^6 como interações de afinidade moderada e, acima de 10^7M^{-1} , interações de afinidade forte. Além disso, outro dado importante refere-se à estequiometria da interação, indicando que há um único sítio de ligação na transaldolase para a morina ($n = 1$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Constantes de ligação K_b e número de sítios de ligação n para a reação de transaldolase com o flavonoide morina em diferentes temperaturas (298, 303 e 310 K).

T (K)	$n \pm 0,05$	$K_b \pm 0,09$ ($\times 10^5 \text{M}^{-1}$)
298	1,06	5,72
303	1,10	5,49
310	1,08	5,35

K: Kelvin; K_b : Constante de associação aparente; n : Número de ligantes por sítio.

O cálculo de K_b em diferentes temperaturas permite analisar os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação como: energia livre, entalpia e entropia.

Estes dados são importantes na análise da especificidade da interação do flavonoide morina com a transaldolase, permitindo uma melhor compreensão de como a estrutura do flavonoide é importante nesse tipo de interação.

6.4.4 - Análise Termodinâmica

Sendo que ΔH° é a variação de entalpia, ΔS° a variação de entropia, R a constante universal dos gases ideais e K_b a constante de ligação em uma correspondente temperatura (T). A Tabela 4 mostra os valores de ΔH° e ΔS° obtidos através da inclinação da reta (ajuste linear) do gráfico de Van't Hoff e extrapolação para a ordenada, apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Gráfico de Van't Hoff ($\ln K$ vs $1/T$) para o complexo Transaldolase-flavonoide para as temperaturas de 298, 303 e 310 K.

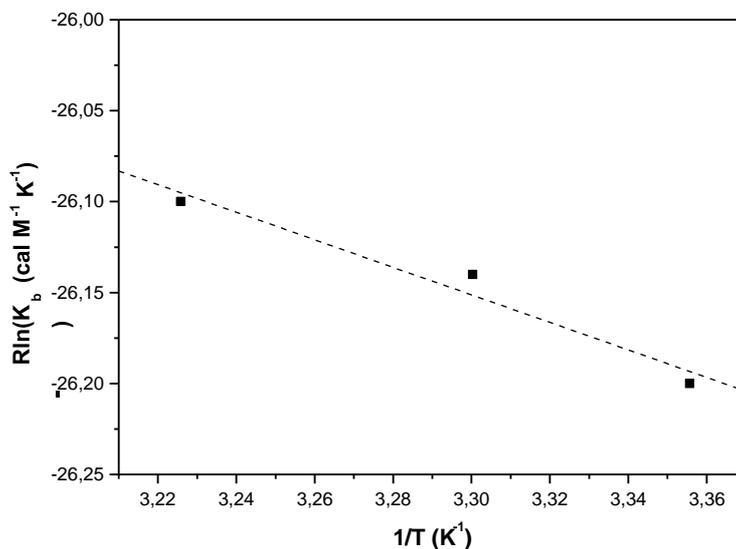


Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos do complexo Transaldolase-Morina em 298,303 e 310K.

Temperatura (K)	ΔH (kcal.mol ⁻¹)	ΔG (kcal.mol ⁻¹)	$-T.\Delta S$ (kcal.mol ⁻¹)
298		-7,85±0,03	-8,03±0,03
303	0,18± 0,02	-7,96±0,03	-8,14±0,03
310		-8,17±0,03	-8,35±0,03

ΔH : entalpia; ΔG : energia livre de Gibbs e; ΔS : entropia

Os valores de variação de entalpia (ΔH) foi determinada a partir da inclinação do gráfico de Van't Hoff. As energias livres de Gibbs (ΔG) foram obtidas utilizando a equação $\Delta G = -RT \ln(K_b)$ e o valor da variação de entalpia $T\Delta S$ foi calculado para cada temperatura utilizando a relação de Gibb: $T\Delta S = \Delta H - \Delta G$.

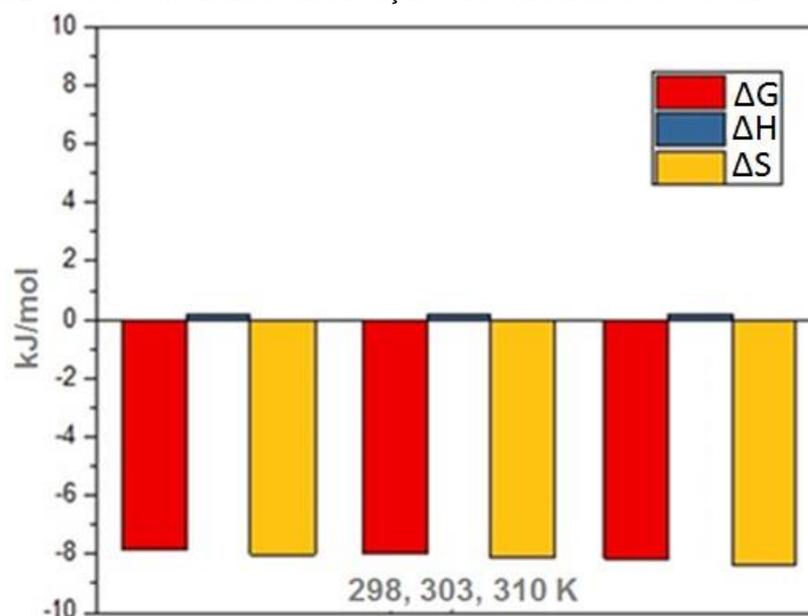
A interação do ligante com uma proteína pode envolver a formação de pontes de hidrogênio, forças de van der Waals, forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, dentre outras. Uma forma de avaliar quais destes modos de interação são predominantes em uma reação, é a determinação de parâmetros termodinâmicos, tais como, variação de entropia e de entalpia da reação. O estudo da dependência da constante de ligação com a temperatura, em uma faixa de valores que não afeta a estrutura da transaldolase conforme mostrados através de experimentos de CD, permite, através do gráfico de Van't Hoff, obter esses valores. O gráfico de Van't Hoff relaciona a variação de temperatura com a variação da constante de associação, dado pela diferença de entalpia (ΔH). A linearidade obtida no gráfico $\ln K$ versus $1/T$, Figura 19, e os valores obtidos para a variação da energia livre de Gibbs, mostrados na Tabela 4, mostram que o processo de interação entre a morina e a transaldolase é espontâneo ($\Delta G < 0$).

Baseando-se nos sinais e magnitudes dos parâmetros termodinâmicos apresentados na Tabela 4 é possível discutir o tipo individual de contribuição das interações que podem ocorrer na formação dos complexos Transaldolase-flavonoide. A comparação entre as magnitudes de variação de entalpia e entropia definirá se a contribuição hidrofóbica ou eletrostática realizará um papel importante na estabilização dos complexos. De acordo com a literatura, valores positivos de ΔS e ΔH acarretam tipicamente em interações hidrofóbicas, enquanto que valores negativos implicam em forças de van der Waals e pontes de hidrogênio.

Baseados em estudos de estrutura da água, uma variação de entropia positiva é geralmente vista como evidência de interação hidrofóbica. Em adição, interação eletrostática específica entre espécies de íons e, solução aquosa é caracterizada por um valor de ΔS positivo, enquanto ΔH é ligeiramente positivo ou negativo (LU et al., 2009). Os valores dos parâmetros termodinâmicos (Figura 20) indicam que a interação entre a Morina e a Transaldolase é dirigida pela

entropia, sugerindo que interações hidrofóbicas desempenham o papel principal na formação do complexo. Entretanto, as interações eletrostáticas (como, por exemplo, pontes de hidrogênio) não podem ser negligenciadas visto que a contribuição hidrofóbica não é suficiente para garantir a estabilidade do complexo de associação.

Figura 20 - Perfil termodinâmico da interação entre Transaldolase e Morina.

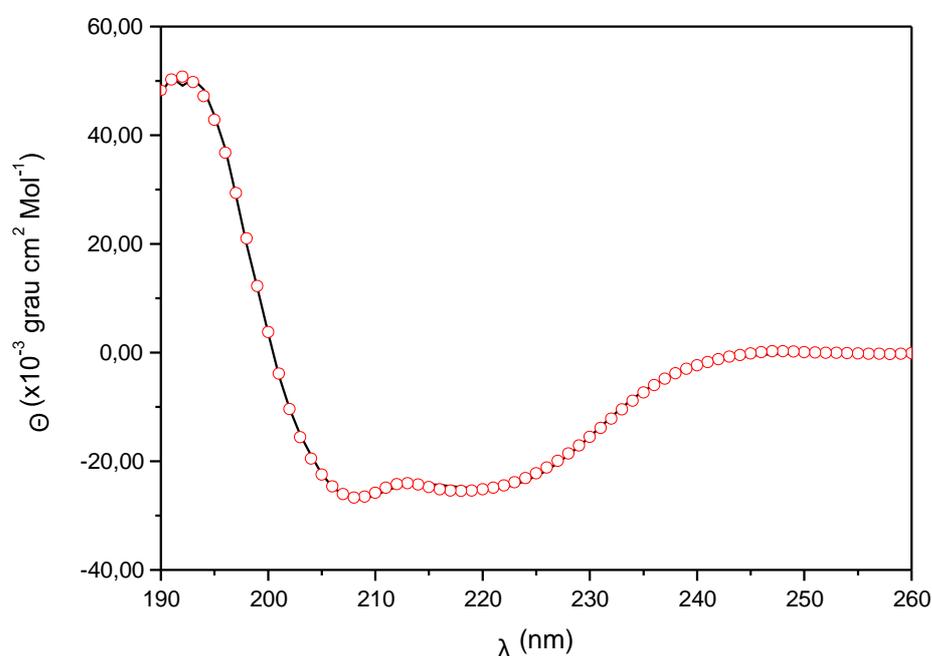


6.5 – Espectros de Dicroísmo Circular para a transaldolase

Os espectros de CD da transaldolase (Figura 21) mostram que esta proteína tem a seguinte contribuição de componentes de estruturas secundárias, conforme análise de deconvolução espectral realizada pelo método de Contin (SREERAMA; WOODY, 2000): 74% de alfa hélice, 0% de folha beta, 7,9% de alças (*turn*) e 18,1 % de estruturas aleatórias. O resultado de modelagem para essa mesma proteína realizada por nosso grupo de pesquisa mostrou uma predominância de alfa hélice, em concordância com os resultados obtidos experimentalmente. Estruturas tridimensionais de enzimas da família das transaldolases com alto grau de homologia com a de *C. pseudotuberculosis* mostram uma maior porcentagem de alfa hélice, formando um barril central ativo

com as folhas beta (SAMLAND et al., 2012). Dessa forma, o resultado de CD revela que a proteína em estudo estava em sua forma nativa, não-desenovelada.

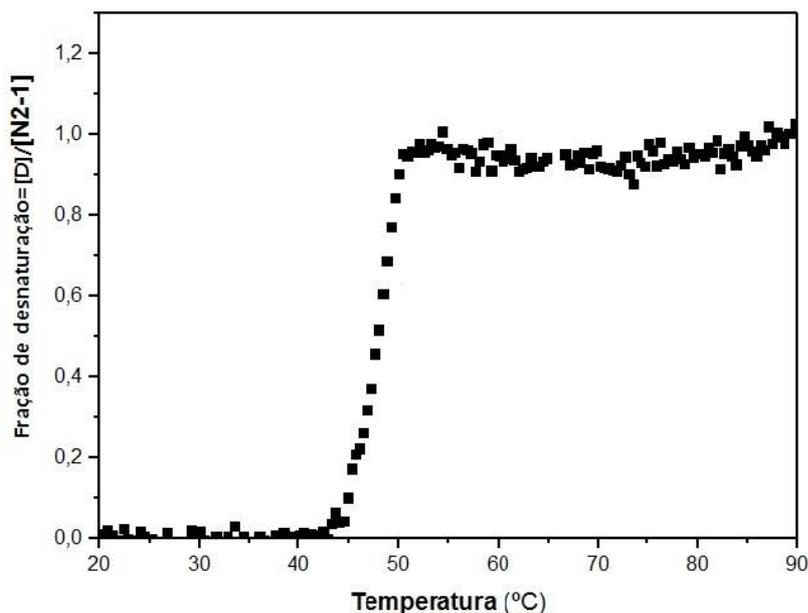
Figura 21 – Espectro de Dicroísmo Circular da transaldolase. A concentração de proteína utilizada para este experimento foi de 0,6 μM em cubeta com caminho óptico de 5,0 mm. A linha contínua corresponde ao espectro de CD e a representação em círculos corresponde ao ajuste dos dados experimentais obtidos da deconvolução do espectro de CD. A proteína apresenta **74% de alfa hélice, 0% de folha beta, 7,9% de alças (turn) e 18,1 % de estruturas aleatórias**. A proteína estava em tampão com 50 mM de NaF e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8,5.



O gráfico (Figura 22) mostra a elipticidade molar a 222 nm em função da temperatura, sendo possível observar a curva de desnaturação térmica da proteína Transaldolase. A partir desta curva é possível obter a temperatura de *melting* (T_m), ou seja, a temperatura na qual 50% das moléculas da proteína estão na estrutura nativa e 50% com estrutura desnaturada. Verificou-se que a temperatura de *melting* da Transaldolase é de 321,15K (48°C), mostrando que esta proteína é termicamente estável em temperaturas abaixo de 48°C e que as medidas selecionadas para a realização dos experimentos de fluorescência, que estão abaixo da temperatura de 37°C, são faixas de temperatura que não

produziram alterações na estrutura secundária da proteína mantendo a mesma enovelada.

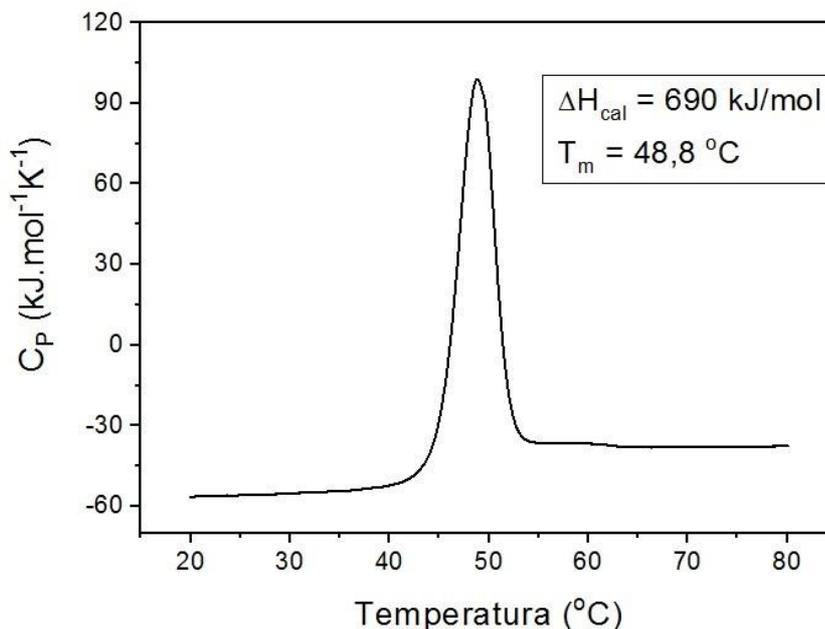
Figura 22 - Desnaturação Térmica da proteína Transaldolase entre 20 e 80 °C em comprimento de onda de 222 nm, a 1 °C/min em cubeta com caminho óptico de 5 mm, apresentando $T_m = 48$ °C. A proteína estava em tampão com 50 mM de NaF e 50 mM de NaH_2PO_4 , pH 8,5.



6.6 - Estabilidade térmica da Transaldolase por DSC

A estabilidade térmica da Transaldolase foi investigada utilizando a técnica de DSC. A Figura 23 mostra o termograma DSC do processo de desenovelamento da Transaldolase. A partir deste termograma, pode-se observar que a Transaldolase apresenta uma temperatura de desnaturação de aproximadamente 48,8 °C, correspondente à capacidade térmica máxima da transição endotérmica. Pode-se observar que este dado confirma a temperatura de *melting* obtida através do Dicroísmo Circular de 48 °C. A varredura de enovelamento (resfriamento) da Transaldolase após sua desnaturação não apresentou transições no termograma DSC, indicando que a desnaturação térmica da Transaldolase é irreversível.

Figura 23 - DSC do processo de desenovelamento da Transaldolase. A curva de excesso de capacidade de calor aparente foi registrada para Transaldolase (23 μ M) em tampão fosfato de sódio (20 mM de NaH_2PO_4 e 100 mM de NaF, pH= 8,0) com taxa de aquecimento de 1°C/min.



6.7 - Análise por Bioinformática

Foi realizada uma busca de sequências de transaldolases de várias espécies, incluindo a proteína Transaldolase de *C. pseudotuberculosis*, através da plataforma BLAST. Foram encontradas cinco sequências de origem bacteriana: *Bacillus subtilis* (PDB 3R8R), *Corynebacterium glutamicum* (PDB 3R5E), *Neisseria gonorrhoeae* (PDB 3CLM), *Thermotoga maritima* (PDB 1VPX), *Thermus thermophilus* (PDB 1WX0) e adicionamos a sequência da espécie *Homo sapiens* (PDB 1F05).

Os resultados apresentados na Figura 24 mostram o alinhamento realizado pela ferramenta CLUSTAL entre as sequências de aminoácidos da proteína Transaldolase de *C. pseudotuberculosis* e das espécies *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus* e *Homo sapiens*. Nas análises, os símbolos asterisco (*) mostram resíduo completamente conservado, ponto (.) indica a conservação entre grupos de propriedades fortemente similares, dois pontos (:) indica a conservação entre os grupos de propriedades fracamente similares e a ausência

de qualquer símbolo mostra a ausência de conservação. Estes símbolos podem ser observados na linha inferior do alinhamento (Figura 24).

Em destaque observam-se os resíduos do sítio ativo da proteína Transaldolase de *C. pseudotuberculosis* comparada com outras espécies. Em vermelho temos resíduos de ácido Aspártico (28 D), em azul temos Treonina (56 T) e Asparagina (58 N), depois em verde temos um ácido glutâmico (124 E), em seguida uma lisina em laranja (160 K), em marrom temos asparagina (183 N) e treonina (185 T) e por último a serina (222 S) e fenilalanina (224 F) em magenta. O alinhamento entre as sequências de transaldolases indicam a conservação dos resíduos do sítio ativo entre as corinebactérias e também entre as outras espécies incluindo a humana.

A tabela 5 traz a porcentagem de identidade (%) de cada sequência usada em relação à Transaldolase de *C. pseudotuberculosis*.

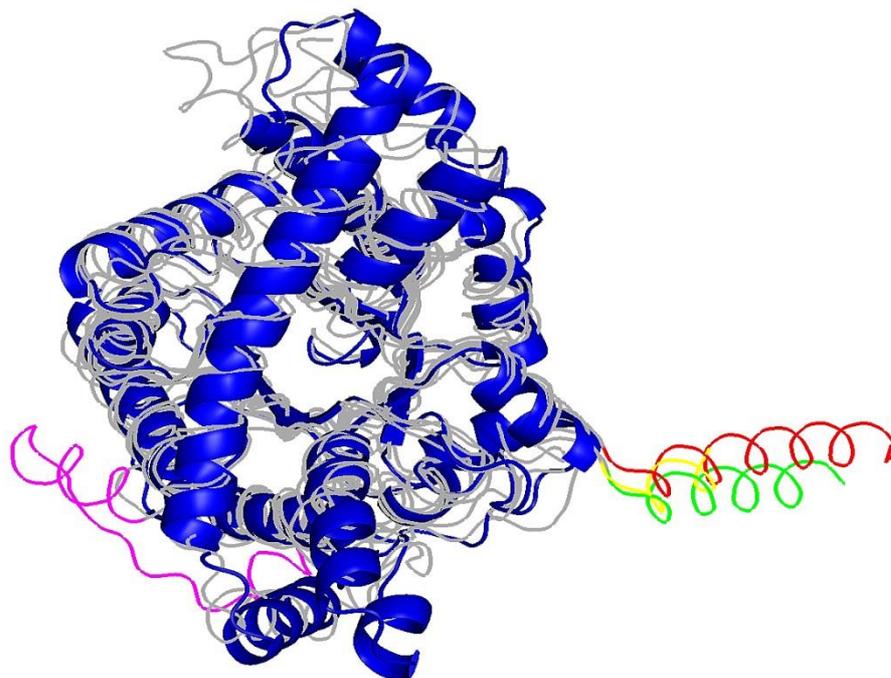
Tabela 5 - Porcentagem de identidade (%) de cada sequência usada em relação a Transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

Espécies	Identidade (%)
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	76%
<i>Thermotoga maritima</i>	39%
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	38%
<i>Thermus thermophilus</i>	32%
<i>Bacillus subtilis</i>	32%
<i>Homo sapiens</i>	28%

Pode-se observar na figura 25 a estrutura tridimensional da proteína de *C. pseudotuberculosis* (em azul) juntamente com as estruturas das espécies, *Corynebacterium glutamicum* (76%), *Thermotoga marítima* (39%), *Neisseria gonorrhoeae* (38%), *Bacillus subtilis* (32%), *Thermus thermophilus* (32%) e *Homo sapiens* (28%), obtidas por modelagem. Para a construção do modelo da proteína *C. pseudotuberculosis* foi utilizado o programa SWISS-MODEL, sendo a estrutura da *Corynebacterium glutamicum* o modelo utilizado como molde, uma vez que foi esta que apresentou maior identidade (76%) e cobertura (99%). Em azul temos a estrutura da proteína em *C. pseudotuberculosis*, pode-se observar que ela é constituída em maior parte de hélices, as estruturas de *Thermotoga marítima*, *Bacillus subtilis* e *Thermus thermophilus* (vermelho, amarelo e verde) apresentaram diferenças em relação a estrutura modelo (em azul), contendo

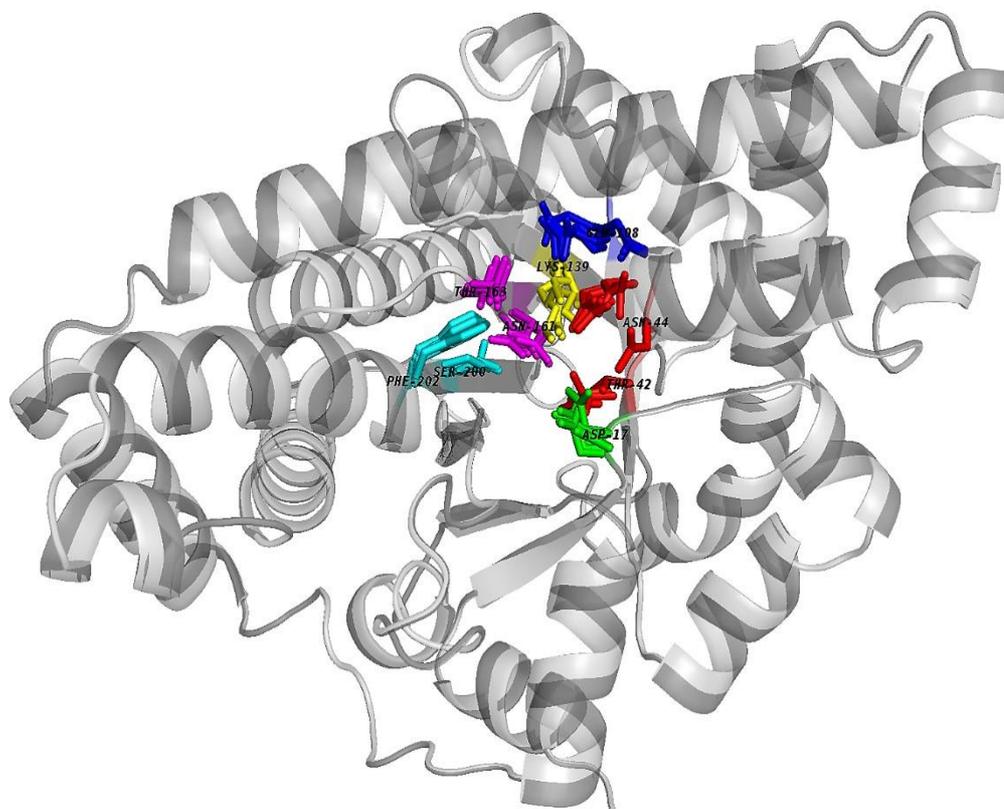
hélices na região C-terminal. A estrutura de *Homo sapiens* (magenta), também apresenta duas hélices e uma volta indo para região C-terminal, no qual é ausente na estrutura de *C. pseudotuberculosis*.

Figura 25 - Alinhamento estrutural do modelo da Proteína Transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, juntamente com aquelas obtidas das espécies: *Corynebacterium glutamicum* (76 %), *Thermotoga marítima* (39 %), *Neisseria gonorrhoeae* (38%), *Bacillus subtilis* (32 %), *Thermus thermophilus* (32 %) e *Homo sapiens* (28 %), apontando as diferenças estruturais entre a *C. pseudotuberculosis* (azul), *Thermotoga marítima*, *Bacillus subtilis* e *Thermus thermophilus* (vermelho, amarelo e verde) e *Homo sapiens* (magenta).



A figura 26 mostra a estrutura tridimensional (obtida por modelagem) da proteína Transaldolase de *C. pseudotuberculosis* com os seus respectivos resíduos do sítio ativo, juntamente com as outras espécies. Nessa figura observa-se que, embora haja diferenças estruturais pontuais (hélices na região C-terminal e duas hélices e uma volta indo para região C-terminal para o *Homo sapiens*), há uma conservação estrutural na região do sítio ativo, indicando que estas regiões com pequenas diferenças estruturais podem ter funções específicas de cada espécie, mas a conservação sequencial e estrutural do sítio ativo preserva a função característica desse sítio ativo que é a ligação a fosfato.

Figura 26 - Estrutura tridimensional representada em cartoon, mostrando a estrutura da proteína Transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis* e os respectivos resíduos de aminoácidos, juntamente com as espécies *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Thermotoga maritima*, *Thermus thermophilus* e *Homo sapiens*. Em amarelo temos resíduos de Lisina (160), em magenta Treonina e Asparagina (56 e 58), em Azul Claro Serina e Fenilalanina (222 e 224), em vermelho Asparagina e Treonina (183 e 185), em verde ácido aspártico (28) e em azul ácido glutâmico (124).



A estrutura da transaldolase de *Corynebacterium pseudotuberculosis* obtida por modelagem apresentou aproximadamente 61 % de alfa hélice, 11 % de folha beta e 28 % de estruturas aleatórias, formando um barril centro ativo de alfa hélice. Esse resultado está próximo ao obtido por Dicroísmo Circular, mostrando que a proteína utilizada durante os experimentos estava em sua forma nativa.

7 - CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo, pode-se concluir que:

A proteína Transaldolase de *C. pseudotuberculosis* foi expressa utilizando-se BL21 (RIL) sob as condições de indução com 0,3 mM de IPTG por 6 horas a 30 °C;

A proteína Transaldolase, com aproximadamente 40 kDa, foi purificada em cromatografia de afinidade em resina His60 Ni Resin (Clontech®) não automatizada seguida de cromatografia de exclusão molecular feita através do sistema ÄKTA *purifier*;

A estrutura secundária da Transaldolase, apresentou a seguinte composição: 74 % de alfa hélice, 0% de folha beta, 7,9 % de alças (*turn*) e 18,1 % de estruturas aleatórias, valores de acordo com o obtido por modelagem molecular para essa proteína. Além disso, a análise da desnaturação térmica mostrou que a temperatura de *melting* é de 48°C, indicando que a proteína é estável, sendo que medidas selecionadas para a realização de experimentos que estão abaixo da temperatura de 37 °C, são faixas de temperatura que não produziram alterações na estrutura secundária da proteína mantendo a mesma enovelada;

A calorimetria diferencial de varredura apresentou uma temperatura de desnaturação de aproximadamente 48,8°C, correspondente à capacidade térmica máxima da transição endotérmica. Observou-se que este dado confirma a temperatura de *melting* dada através do Dicroísmo Circular de 48°C e que a desnaturação térmica da Transaldolase é irreversível.

A interação entre o flavonoide Morina e a enzima Transaldolase apresentou mecanismo de supressão estático-dinâmico, ou seja, a supressão é influenciada pela formação de um complexo e pelos eventos colisionais. Também apresentou uma constante de associação aparente (K_b) de 10^{-5} e 1 sítio de interação entre Transaldolase e Morina. A análise termodinâmica mostrou que o processo de interação entre a Morina e a Transaldolase é espontâneo $\Delta G < 0$, endotérmico $\Delta H > 0$ e entrópico $\Delta S < 0$. Os valores indicam que a interação é dominada por interações hidrofóbicas, entretanto, as interações eletrostáticas não podem ser negligenciadas visto que a contribuição hidrofóbica não é suficiente para a garantir a estabilidade do complexo de associação;

Baseado nas análises de bioinformática observou-se que, apesar de existirem diferenças estruturais pontuais (hélices na região C-terminal e duas

hélices e uma volta indo para região C-terminal para o *Homo sapiens*) há uma conservação estrutural na região do sítio ativo, indicando que estas regiões com pequenas diferenças estruturais podem ter funções específicas de cada espécie, mas a conservação sequencial e estrutural do sítio ativo preserva a função característica desse sítio ativo que é a ligação a fosfato.

Assim, sabendo-se que a proteína Transaldolase é a proteína chave no processo das infecções por *Corynebacterium pseudotuberculosis* e considerando as propriedades antibacterianas e antiproliferativas do flavonoide morina, sugere-se que este composto possa ser investigado para os seus usos específicos. Sugere-se que a interação da transaldolase com a Morina possa exercer um papel de carreador ou seja, uma forma pela qual a proteína leva a molécula para o local que ela atua, e, assim, a Morina consiga realizar sua função antiproliferativa e bloquear as infecções.

8 - REFERÊNCIAS

- ALEMAN, M.; SPIER, S. J.. ***Corynebacterium* infection**. In: Smith PB. Large animal internal medicine. 3ª ed. St Louis: Mosby, 2001. p.1078-84.
- ALLEWELL, N. M.; NARHI, L. O.; RAYMENT, I. **Molecular Biophysics for the Life Sciences**. Springer, 2013.
- AL-NUMAIR, K.S. et al., **A flavonoid, prevents lysosomal damage in experimental myocardial ischemic rats**. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.6, n.18, p.3445-3449, 2012.
- ANDRADE, JOSÉ SÓSTENES.; AZEVEDO, SÉRGIO.; TELES, JOSÉ.; HIGINO, SILVANO.; AZEVEDO, EDISIO. **Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em caprinos e ovinos do semiárido paraibano**. *Pes.Vet.Bras*, vol 32. Rio de Janeiro,2012.
- AVIRAM, M.; FUHRMAN, B.. **LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: role of prooxidants vs. antioxidants**. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 188, 1-2, 149-159 (1998).

BAIRD, G. J.; SYNGE, B.; DERCKSEN, D.. **Survey of caseous lymphadenitis seroprevalence in British terminal sire sheep breeds.** Vet Rec. 2004; 154: 505-6.

BAIRD, G. J.; FONTAINE, M. C.. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis.** J Comp Pathol. 2007; 137: 179-210.

BAYAN, N.; HOUSSIN, C.; CHAMI, M.; LEBLON, G.. **Mycomembrane and Slayer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications,** J. Biotechnol. 104 (2003) 55–56.

BELCHIOR, S. E.; GALLARDO, A.; ABALOS, A.; JODOR, N.; JENSEN, O.. **Actualización sobre linfadenitis caseosa: el agente etiológico y la enfermedad.** Rev Vet Argent. 2006; 23: 258-78.

BHAVSAR, A.P.; GUTTMAN, J.A.; FINLAY, B.B. **Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens.** Nature. 449:827-34, 2007.

BILLINGTON, S.J.; ESMAY, P.A.; SONGER, J.G.; JOST, B.H. **Identification and role in virulence of putative iron acquisition genes from *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** FEMS Microbiol Lett. 208:41–45, 2002.

BINNS, S. H.; BAILEY, M.; GREEN, L. E.. **Postal survey of ovine caseous lymphadenitis in the United Kingdom between 1990 and 1999.** Vet Rec. 2002; 150: 263-8.

BRAHMS, S.; BRAHMS, J. **Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism.** J Mol Biol, v.138 (2), p.149–178, 1980.

CETINKAYA, B.; KARAHAN, M.; ATIL, E.; KALIN, R.; DE BAERE, T.; VENECHOUTTE, M.. **Identification of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats by PCR.** Vet Microbiol. 2002; 88: 75-83.

COSTA, L. F. M.. ***Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente etiológico da linfadenite caseosa em caprinos.** Rev Cienc Med Biol. 2002; 1: 105-15.

CUBERO, P. M. J.; REAL, V. F.; GONZÁLEZ, C. M.; LEÓNVISCAÍNO, L.. **Epidemiología de la pseudotuberculosis.** Rev Ovis. 2002. Available from: <<http://exopol.com/cirulares/205.html>>.

DOHERR, M. G.; CARPENTER, T. E.; HANSON, K. M. P.; WILSON, W. D.; GARDNER, I. A.. **Risk factors associated with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in California horses.** Prev Vet Med. 1998; 35: 229-39.

DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.C.; OLIVEIRA, S.C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. ***Corynebacterium pseudotuberculosis*: microbiology, biochemical properties, pathogenesis and molecular studies of virulence**. Vet Res. 37:201-218, 2006.

DORELLA, F. A.; PACHECO, L.G.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R.W.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. **Antigens of *Corynebacterium pseudotuberculosis* and prospects for vaccine development**. Expert Reviews Vaccines, v. 8, p. 205-213, 2009.

FASMAN, G. D. **Circular Dichroism and the conformational analysis of biomolecules**, Plenum Press, New York, 1996.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G.; CONNOR, K. M.; RUDGE, K.; SALES, J.; DONACHIE, W.. **Vaccination confers significant protection of sheep against infection with virulent United Kingdom strain of *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Vaccine. 2006; 24: 5986-96.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. **Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server**. The Proteomics Protocols Handbook, pp 571-607. 2005.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; LIMA, J. L. F. C.; MIRA, L.; CORVO, M. L. **Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Activity Mediated by Flavonoids**. Current Medicinal Chemistry, 15, 1586-1605, 2008.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, I.; SANCHEZ, B.; RUIZ, L.; TURRONI, F.; VENTURA, M.; RUASMADIEDO, P.; GUEIMONDE, M.; MARGOLLES, A. **Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation**. Appl Environ Microbiol. 78:3992-8. 2012. doi: 10.1128/AEM.08024-11.

GREENFIELD, N.; FASMAN, G.D. **Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation**. Biochemistry, v.8 (10), p.4108- 4116, 1969.

GUEDES, MARIA.; SOUZA, BIANCA.; SOUSA, THIAGO.; LOUREIRO, DAN.; COSTA, LILIA.; AZEVEDO, VASCO.; MEYER, ROBERTO.; PORTELA, RICARDO.; **Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos**. Pesq. Vet. Bras. 35(8):701-708, 2015.

GUIMARÃES, A.S.; SEYFFERT, N.; PORTELA, R.W.D., MEYER, R.; CARMO, F.B., CRUZ, J.C., LAGE; A.P., HEINEMANN, M.B., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.; GOUVEIA, A.M.G. **Caseous lymphadenitis in sheep flocks of the state of Minas Gerais, Brazil: Prevalence and management surveys**. S Rum Res. 87:86-91, 2009.

GUTZEIT, H. O.; HENKER, Y.; KIND, B.; FRANZ, A. **Specific interactions of quercetin and other flavonoids with target proteins are revealed by elicited fluorescence.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 318: 490–495, 2004.

HODGSON, A. L.; CARTER, K.; TACHEDJIAN, M.; KRYWULT, J.; CORNER, L.A.; McCOLL, M.; CAMERON, A. **Efficacy of an ovine caseous lymphadenitis vaccine formulated using a genetically inactive form of the *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D,** *Vaccine*, v. 17, p. 802–808, 1999.

JOHNSON, W. C. **Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures.** *Proteins*, v.35 (3), p.307–312, 1999.

KURIA, J.K.N.; MBUTHIA, P.G.; KANGETHE, E.K.; WAHOME, R.G. **Caseous lymphadenitis in goats: the pathogenesis, incubation period and serological response after experimental infection.** *Vet Res Commun.* 25:8997, 2001.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy.** New York: Kluwer Academic Publishers/Plenum Press, 2nd ed., 1999.

LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J.. **The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 1, 65-72, 2010.

LAWS, W.; CONTINO, P. **Fluorescence quenching studies: Analysis of nonlinear Stern-Volmer data. Method.** *Enzymol.*, 210 pp. 448—463,1992.

LEARDINI, N.; PRIETO, M.; MARTINEZ, C.; AGUERRE, L.; LOAYSA, R.. **Infecciones por bacilos gram positivos aeróbicos, corinebacterias, bacillus y actinomicetes.** Buenos Aires: Curso A.N.L.I.S. “Dr Carlos Malbran”. Departamento de Bacteriología, Servicio de Bacteriología Especial; 2002.

LEES, J. G.; MILES, A. J.; WIEN, F.; WALLACE, B. A. **A reference databse for circular dischroism spectroscopy covering fold and secondary structure space.** *Bioinformatics*, v.22 (16), p.1955–1962, 2006.

LIANDA R L. P.; CASTRO R. N. **Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*** *Química Nova* v. 31, n. 6, p. 1472-1475, 2008.

LIPSKY, B.A.; GOLDBERGER, A.C.; TOMPKINS, L.S.; FLORDE, J.J. **Infections caused by nondiphtheria corynebacteria,** *Rev. Infect. Dis.*, v. 4, p. 1220–1235, 1982.

LIMA, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica.** In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.* Argos, Chapecó, p. 479-499, 2001.

LIU, D.T.; CHAN, W.M.; FAN, D.S.; LAM, D.S. **An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Br J Ophthalmol. 89:245–46, 2005.

MANAVALAN, P.; JOHNSON, W. C. **Variable Selection Method Improves the Prediction of Protein Secondary Structure from Circular Dichroism Spectra**. Analytical Biochemistry, 167, 76-85 (1987).

MCKEAN, S.; DAVIES, J.; MOORE, R. **Identification of macrophage induced genes of *Corynebacterium pseudotuberculosis* by differential fluorescence induction**. Microb Infect. 7:1352- 63, 2005.

MCKEAN, S.C.; DAVIES, J.K.; MOORE, R.J. **Expression of phospholipase D, the major virulence factor of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, is regulated by multiple environmental factors and plays a role in macrophage death**. Microbiol. 53:2203-2211, 2007a.

MCKEAN, S. C.; DAVIES, J. K.; MOORE, R. J. **Probing the heat shock response of *Corynebacterium pseudotuberculosis*: The major virulence factor, phospholipases D, is downregulated**. Res Microbiol.; 158: 279-86, 2007b

MEYER, R.; REGIS, L.; VALE, V.; PAULE, B.; CARMINATI, R.; BAHIA, R. et al. **In vitro IFN-gamma production by goat blood cells after stimulation with somatic and secreted *Corynebacterium pseudotuberculosis* antigens**. Vet Immunol Immunopathol. 2005; 107: 249-54.

MILLS, A. E.; MITCHELL, R. D.; LIM, E. K.. ***Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis**. Pathology. 1997; 29: 231-3.

MOLLER, K.; AGERHOLM, J. S.; AHRENS, P.; JENSEN, N. E.; NIELSEN, T. K.. **Abscesses disease, caseous lymphadenitis, and pulmonary adenomatosis in imported sheep**. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2000; 47: 55-62.

NASO, L.G. et al., **Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as 4 antio-xidant and specific anti-cancer agents**. Chemico-Biological Interactions, v.206, n.2, p.1-13, 2013.

NIERO, R.; MALHEIROS, A.; BITTENCOURT, C. M. S.; BIAVATTI, M. W.; LEITE, S. N.; CECHINEL FILHO, V. **Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos**. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Editora UNIVALI, 239, 2003.

NIJVELDT, R.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.; BOELEN, P.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. **Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potencial applications**. Am. J. Clin. Nutr., 74 (4), pp. 418-425, 2001.

NOZAKI, C. N.; FARIA, M. A. R.; MACHADO, T. N. M.. **Extirpação cirúrgica dos abscessos da linfadenite caseosa em caprinos**. Arq Inst Biol. 2000; 67: 187-9.

PATON, M. W.; WALKER, S. B.; ROSE, I. R.; WATT, G. F.. **Prevalence of caseous lymphadenitis and usage of caseous lymphadenitis vaccines in sheep flocks**. Aust Vet J. 2003; 81: 91-5.

PAULE, B. J. A.; AZEVEDO, V.; REGIS, L. F.; CARMINATI, R.; BAHIA, C.R.; VALE, V. L.; et al. **Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon production, IgG avidity and antigen recognition by Western blotting**. VetImmunol Immunopathol. 2003; 96: 129-39.

PEDRIALI, C. A., **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005.

PEPIN, M.; BISRAME, A.; MARLY, J.. ***Corynebacterium pseudotuberculosis*; biochemical properties, production of toxin and virulence of ovine and caprine strains**. Ann Rech Vet. 1989; 20: 111-5.

PEREIRA, W. L.; OLIVEIRA, T. T.; KANASHIRO, M.; COSTA, M. R.. **Ação antiproliferativa do flavonoide morina e do extrato da folha de oliveira (*Olea europaea* L.) contra a linhagem de célula H460**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v. 17, n. 4, supl. I, p. 798-806, 2015.

PINHEIRO, P. F.; JUSTINO, G. C.. **Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds – A Review of Spectroscopic Applications**. Phytochemicals – A Global Perspective of their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech, DOI: 10.5772/29152 (2012).

PUGH, G. D.. **Sheep and goat medicine**. New York: Elsevier; 2004.

QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R.. ***Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi***. In: Quinn PJ. Clinical veterinary microbiology. London: Wolfe, 1994. p.881-4.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C.. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of catlee, sheep, pigs, goats and horses**. 9th ed. Philadelphia: Bailliere Tindall, 2007. p. 830-9.

RIBEIRO, M. G.; DIAS JUNIOR, J. G.; PAES, A. C.; BARBOSA, P. G.; NARDI JUNIOR, G.; LISTONI, F. J. P **Punção aspirativa com agulha fina no diagnóstico do *Corynebacterium pseudotuberculosis* na linfadenite caseosa caprina**. Arq Inst Biol. 2001; 68: 23-8.

RIET-CORRÊA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A.. **Doenças de ruminantes e equinos**. 2ª ed. São Paulo: Varela; 2004.

RUIZ, J.C.; D'AFONSECA, V.; SILVA, A.; ALI, A.; PINTO, A.C.; SANTOS, A.R.; ROCHA, A.A.; LOPES, D.O.; DORELLA, F.A.; PACHECO, L.G.; COSTA, M.P.; TURK, M.Z.; SEYFFERT, N.; MORAES, P.M., SOARES; S.C., ALMEIDA, S.S.; CASTRO, T.L. et al. **Evidence for reductive genome evolution and lateral acquisition of virulence functions in two *Corynebacterium pseudotuberculosis* strains**. PLoS One. 6:e18551, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0018551.

SAMLAND, A. K.; SCHURMANN, M.; INOUE, T.; HUF, S.; SCHNEIDER, G.; SPRENGER, G. A.; SANDALOVA, T. **Conservation of structure and mechanism within the transaldolase enzyme family**. FEBS J. 2012.

SANTIAGO, LAUANA.; PINHEIRO, RAYMUNDO.; ALVES, FRANCISCO.; SANTOS, VANDERLAN.; RODRIGUES, APOLIANA.; LIMA, ANA.; OLIVEIRA, EDUARDO.; ALBUQUERQUE, FERNANDO. **In vivo evaluation of antiseptics and disinfectants on control of Caseous Lymphadenitis: clinical, haematological, serological and microbiological monitoring**. Arq.Inst.Biol. vol 80. São Paulo, 2013

SEYFFERT, N.; GUIMARÃES, A.S.; PACHECO, L.G.C.; PORTELA, R.W.; BASTOS, B.L.; DORELLA, F.A.; HEINEMANN, M.B.; LAGE, A.P.; GOUVEIA, A.M.G.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. **High seroprevalence of caseous lymphadenitis in Brazilian goat herds revealed by *Corynebacterium pseudotuberculosis* secreted proteins-based ELISA**. Res Vet Sci. 88:50-55, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G. et al., **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**, 5ª ed., Editora da UFSC: Santa Catarina, 2004.

SMITH, P. B.. **Large animal internal medicine**. 4th. St Louis: Mosby; 2003.

SONGER, J. G.; BECKENBACH, K.; MARSHALL, M. M.; OLSON, G. B.; KELLEY, L.. **Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis***. Am J Vet Res. 1988; 49: 221-6.

SPENCER, J. P.; VAUZOUR, D.; RENDEIRO, C. **Flavonoids and cognition: the molecular mechanisms underlying their behavioural effects**. Archives of Biochemistry and Biophysics, 492, 1-2, 1-9, 2009.

SPENCER, J. P. **The impact of fruit flavonoids on memory and cognition**. British Journal of Nutrition, 31, 6, 546-557, 2010.

SREERAMA, N.; WODDY, R. W. **Estimation of Protein Secondary**

Structure from Circular Dichroism Spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR Methods with an Expanded Reference Set. *Analytical Biochemistry*, 287 (2): 252–260, 2000.

TABOADA E, et al.. **Comparative genomic analysis of *Campylobacter jejuni* associated with Guillain-Barré and Miller Fisher syndromes: neuropathogenic and enteritis-associated isolates can share high levels of genomic similarity.** *BMC Genomics* 8:359, 2007.

TAMIRU, W. et al., **Evaluation of the effects of 80% methanolic leaf extract of *Cayluseabyssinica* (fresen.) Fisch&Mey.** On glucose handling in normal, glucose loaded and diabetic rodents. *BCM Contemporary and Alternative Medicine*, v. 12, n. 1, p. 151, 2012.

TENG, Y.; ZHANG, H.; LIU, R. **Molecular interaction between 4inoantipyrine and catalase reveals a potentially toxic mechanism of the drug.** *Mol. BioSyst.*, 7: 3157–3163, 2011.

VALE, V.; FREIRE, S.; RIBEIRO, M.; REGIS, L.; BAHIA, R.; CARMINATI, R. et al. **Reconhecimento de antígenos por anticorpos de caprinos naturalmente infectados ou imunizados contra *Corynebacterium pseudotuberculosis*.** *Rev Cienc Med Biol.* 2003; 2: 192-200.

VALEUR, B. **Molecular fluorescence.** Weinheim: Wiley-VCH,2002.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica.** Porto Alegre: Artmed, 2002, 4ª edição; 382-423.

WILLIAMSON, L.H. **Caseous lymphadenitis in small ruminants.** *Vet Clin North Am Food Anim. Pract.*17:359-71, 2001.

WINTER, A. C.. **Caseous lymphadenitis: an increasing cause for concern.** *Vet Rec.* 1997; 140: 611.

YERUHAM, I.; BRAVERMAN, Y.; SHPIGEL, N. Y.; CHIZOV-GINZBURG, A.; SARAN, A.; WINKLER, M.. **Mastitis in dairy cattle caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* and feasibility of transmission by houseflies.** *Vet Q.* 1996; 18: 87-9.

ZHANG, Z.; LIAN, X.; LI, S. STRINGER, J.L. **Characterization of Chemical ingredients and anticonvulsant activity of American Skullcap (*Scutellaria lateriflora*).** *Phytomedicine*, v 16, p. 485-493,200

