

Fernanda Serrano Romano

**Expressão, purificação e análise da atividade catalítica das SMases D
de *Austwickia chelonae*, *Arcanobacterium haemolyticum*,
Corynebacterium pseudotuberculosis e *Trichophyton rubrum***

São José do Rio Preto

2020

Fernanda Serrano Romano

**Expressão, purificação e análise da atividade catalítica das SMases D
de *Austwickia chelonae*, *Arcanobacterium haemolyticum*,
Corynebacterium pseudotuberculosis e *Trichophyton rubrum***

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Dr. Ricardo Barros Mariutti

São José do Rio Preto

2020

R759e	Romano, Fernanada Serrano Expressão, purificação e análise da atividade catalítica das SMases D de <i>Austwickia chelonae</i>, <i>Arcanobacterium haemolyticum</i>, <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> e <i>Trichophyton rubrum</i> / Fernanada Serrano Romano. -- São José do Rio Preto, 2020 74 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientador: Ricardo Barros Mariutti 1. Microbiologia. 2. Bactérias. 3. Cristalização. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Fernanda Serrano Romano

**Expressão, purificação e análise da atividade catalítica das SMases D
de *Austwickia chelonae*, *Arcanobacterium haemolyticum*,
Corynebacterium pseudotuberculosis e *Trichophyton rubrum***

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ricardo Barros Mariutti
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Fábio Rogério de Moraes
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof (a). Dr^a. (a) Paola Jocelan Scarin Provazzi
Universidade Instituto Municipal de Ensino Superior de Catanduva-
IMES/FAFICA

São José do Rio Preto

3 de julho de 2020

A todos os pesquisadores que continuam na luta e mesmo com as adversidades e problemas não desistem de continuar e seguir em frente. Vocês são sensacionais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe e a minha avó, pois sem elas nada disso teria sido possível.

Ao Prof. Dr. R. K. Arni, pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização de todo esse trabalho. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Dr. Ricardo Mariutti, pela excelente orientação tanto acadêmica como pessoal, pela paciência, apoio e não ter desistido de mim diante de todas as adversidades que passei.

Dr. Fábio Rogerio de Moraes pela ajuda com os experimentos em ressonância magnética nuclear.

Prof^a. Dr^a Marília de Freitas por todo o suporte e auxílio nos experimentos de viabilidade celular.

Carolina, Angela e Giovanna, por serem minhas parceiras de laboratório, pelo incentivo de continuar e persistir. Pela ajuda nos experimentos, ensinamentos e por não desistirem de mim.

Aos meus amigos e família que criei nessa jornada: Willy, Valdir, Stefano, Elaine, Juliana, Guilherme Silva, Guilherme Putre, Vinicius, Gauy, Madalena e Raissa. Pelos abraços, por secar as minhas lágrimas, afastar meus desesperos, acreditar em mim e me ajudar quando eu não via mais luz no fim do túnel.

Ao meu pai que sempre esteve por mim e comigo, mesmo que as vezes distante.

Minhas tias, primas e tio, pela viagem inesquecível, pela animação, carinho, preocupação, generosidade e por saber que sempre posso correr ao encontro de vocês.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

RESUMO

A esfingomielinase D (SMase D) é uma hidrolase fosfórica que cliva esfingomielinas em ceramida e fosforilcolina, alterando a fluidez, permeabilidade e cargas da membrana citoplasmática além de estar relacionada à necrose de macrófagos e inflamação pulmonar. Além disso, é conhecida por ser uma enzima dermonecrótica, que permite a disseminação patogênica pelo hospedeiro. Embora muitas vezes classificadas como fosfolipases D, não apresentam a sequência HKD conservada na família dessas enzimas, as quais podem ser encontradas nos organismos *Trichophyton rubrum*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Austwickia chelonae* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, além de outros organismos. Esses quatro micro-organismos tiveram seus protocolos de expressão e purificação em larga escala estabelecidos e análises de viabilidade celular utilizando linhagens de células HaCaT demonstraram o potencial de toxicidade desses quatro organismos e permitiram encontrar um possível inibidor (doxiciclina) para futuros testes in vivo. Estudos de catálise enzimática por RMN demonstram o padrão de velocidade catalítica dessas proteínas na presença do substrato lisofosfatidilcolina (LPC).

Palavras-chave: *Arcanobacterium haemolyticum*. *Austwickia chelonae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Trichophyton rubrum*. SMase D. HaCaT. Catálise enzimática.

ABSTRACT

Sphingomyelinase D (SMase D) is a phosphoric hydrolase that cleaves sphingomyelins in ceramide and phosphorylcholine, changing the fluidity, permeability and cytoplasmic membrane loads, in addition to being related to macrophage necrosis and pulmonary inflammation. In addition, it is known to be a dermonecrotic enzyme, which allows pathogenic dissemination by the host. Although they are often classified as phospholipases D, they do not have the HKD sequence conserved in the family of these enzymes, which can be found in the organisms *Trichophyton rubrum*, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Austwickia chelonae* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*, in addition to other organisms. These four microorganisms had their large scale expression and purification protocols established and cell viability analyzes using HaCaT cell lines demonstrated the toxicity potential of these four organisms and allowed to find a possible inhibitor (doxycycline) for future in vivo tests. Studies of enzymatic catalysis by NMR demonstrate the pattern of catalytic rate of these proteins in the presence of the substrate lysophosphatidylcholine (LPC).

Keywords: *Austwickia chelonae*. *Trichophyton rubrum*. *Arcanobacterium haemolyticum*. *Corynebacterium pseudotuberculosis*. SMase D. HaCaT. Enzymatic catalysis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados das SMases D obtidos em análise pelo ProtParam.	38
Tabela 2: Valores obtidos ao gerar os modelos das proteínas de <i>C. pseudotuberculosis</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>A. haemolyticum</i> e <i>A. chelonae</i> na ferramenta <i>SWISS MODEL</i>	41
Tabela 3: Tampões utilizados na purificação.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sítio de clivagem da esfingomielina que é reconhecido pelas SMases C e D e seus produtos de clivagem. SMase C originam os produtos ceramida e fosforilcolina, enquanto a SMase D ceramida-1- fosfato e colina.	17
Figura 2: Estrutura tridimensional de uma esfingomielinase evidenciando os principais resíduos de aminoácidos funcionais (His12, His47, Glu32, Asp34, Asp91) do sítio catalítico e o íon Mg^{2+} sendo representado pela esfera verde. O loop catalítico B (azul), loop variável E (verde) e o loop flexível F (vermelho). Adaptado de MURAKAMI et al, 2005.....	20
Figura 3: Mecanismo da catálise das SMases D	20
Figura 4: Comparação entre o R_R e o R_h da Lisozima.	25
Figura 5: Identidade entre as sequências primárias das SMases D de <i>C. pseudotuberculosis</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>A. haemolyticum</i> e <i>A. chelonae</i>	39
Figura 6: Alinhamento das sequências das SMases D de <i>C. pseudotuberculosis</i> , <i>T. rubrum</i> , <i>A. haemolyticum</i> e <i>A. chelonae</i> . As setas em verde indicam os resíduos de histidina do sítio ativo e as setas em amarelo indicam os resíduos que coordenam o íon Mg^{2+}	40
Figura 7: Modelos 3D das SMases D de <i>A. haemolyticum</i> (vermelho), <i>A. chelonae</i> (verde), <i>T. rubrum</i> (rosa) e <i>C. pseudotuberculosis</i> (azul). O íon magnésio está representado por esfera cinza. Todas as estruturas foram geradas por SWISS-MODEL e analisadas utilizando PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, LLC).	42
Figura 8: Western blot de <i>A. haemolyticum</i> evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. (M): marcador molecular em KDa; (1): Linhagem T1, fração total; (2) Linhagem Origami 2, fração total; (3) Linhagem T1, fração sobrenadante; (4): Linhagem Origami 2, fração sobrenadante. Todas em temperatura de 37 °C.	43
Figura 9: Western blot de <i>T. rubrum</i> evidenciando reação específica do anticorpo anti-Histag. Todas expressas em linhagem T1. (M): marcador molecular em kDa; (1): Fração total, 20 °C, sem detergente; (2) Fração total; 20 °C, com detergente; (3) Fração total, 30°C sem detergente; (4): Fração total, 30° C, com detergente; (5) Fração sobrenadante, 20°C, sem detergente; (6): Fração sobrenadante, 20 °C, com detergente; (7): Fração sobrenadante, 30 °C, sem detergente; (8): Fração sobrenadante, 30 °C com detergente.	44

Figura 10: Western blot de <i>A. chelonae</i> evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. (M) : marcador molecular em kDa; (1) : Linhagem T1, fração total; (2) : Linhagem T1 sobrenadante. Todas em temperatura de 20 °C.	44
Figura 11: Western blot de <i>C. pseudotuberculosis</i> evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. (M) : marcador molecular em kDa; (1) : Linhagem T1, fração total; (2) : Linhagem T1 sobrenadante. Todas em temperatura de 30 °C.....	44
Figura 12: SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da expressão e purificação das SMases D de <i>A. haemolyticum</i> a 37 °C (A) e de <i>T. rubrum</i> (B) a 20 °C na linhagem T1 de <i>Escherichia coli</i> através da intensidade das bandas referentes ao produto de purificação utilizando Ni-NTA com diferentes concentrações de imidazol. (M) : marcador molecular em (kDa); (1) : tampão de lavagem 40 mM; (2) : tampão de lavagem 60 mM; (3) : tampão de lavagem 80 mM e (4) : eluição 400 mM.	46
Figura 13: SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da expressão da SMase D de <i>A. chelonae</i> a 20 °C na linhagem T1 de <i>Escherichia coli</i> através da intensidade das bandas referentes ao produto de purificação utilizando Ni-NTA com diferentes concentrações de imidazol. (M) : marcador molecular (kDa); (1) : tampão de lavagem 40 mM; (2) : tampão de lavagem 60 mM; (3) : tampão de lavagem 80 mM e (4) : eluição 400 mM.....	46
Figura 14: SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da expressão da SMase D de <i>C. pseudotuberculosis</i> a 30 °C na linhagem T1 de <i>Escherichia coli</i> através da intensidade das bandas referentes ao produto de purificação utilizando Ni-NTA com diferentes concentrações de imidazol. (M) : marcador molecular (kDa); (1) : tampão de lavagem 40 mM; (2) : tampão de lavagem 60 mM; (3) : tampão de lavagem 80 mM e (4) : eluição 400 mM.	47
Figura 15: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de <i>A. haemolyticum</i> em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume de eluição em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.	48
Figura 16: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração da SMase D de <i>A. haemolyticum</i> . (M) marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem as frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier.....	49

Figura 17: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de <i>A. chelonae</i> em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume de eluição em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.	49
Figura 18: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração da SMase D de <i>A. chelonae</i> . (M) marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem as frações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier	50
Figura 19: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de <i>C. pseudotuberculosis</i> em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.	50
Figura 20: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração da SMase D de <i>C. pseudotuberculosis</i> (M) marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem às frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier.	51
Figura 21: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de <i>T. rubrum</i> em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume de eluição em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.	51
Figura 22: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração de <i>C. pseudotuberculosis</i> (M) marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem as frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier.....	52
Figura 23: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de <i>A. chelonae</i>	53
Figura 24: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de <i>A. haemolyticum</i>	53

Figura 25: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de <i>C. pseudotuberculosis</i>	53
Figura 26: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de <i>T. rubrum</i>	54
Figura 27: Análise dos gráficos de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de <i>T. rubrum</i> em tampão 20 mM MES pH 5,5.....	54
Figura 28: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT da SMase D de <i>A. chelonae</i> após 72 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$	55
Figura 29: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com o inibidor doxíciclina nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$	56
Figura 30: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com o inibidor lapachol nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$	57
Figura 31: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com o inibidor tetraciclina após 96 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$	57
Figura 32: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com a esfingomielinase D de <i>A. chelonae</i> complexada com seus inibidores tetraciclina, doxíciclina e lapachol após 96 horas de incubação na concentração 40 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$	58
Figura 33: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT da SMase D de <i>C. pseudotuberculosis</i> após 72 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$	59
Figura 34: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT da SMase D de <i>A. haemolyticum</i> após 72 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$	59
Figura 35: Análise das triplicadas do espectro de <i>A. chelonae</i> . Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).....	60

Figura 36: Análise das triplicadas do espectro de <i>A. haemolyticum</i> . Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).	61
Figura 37: Análise das triplicadas do espectro de <i>T. rubrum</i> . Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).	62
Figura 38: Análise das triplicadas do espectro de <i>C. pseudotuberculosis</i> . Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).	62
Figura 39: Comparação da catálise das SMases D de <i>A. chelonae</i> (azul), <i>A. haemolyticum</i> (vermelho), <i>T. rubrum</i> (amarelo) e <i>C. pseudotuberculosis</i> (verde) em relação a formação do produto. Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM)	61
Figura 40: Espectro do dicroísmo circular das SMases D (A): <i>A. haemolyticum</i> , (B): <i>A. chelonae</i> , (C): <i>C. pseudotuberculosis</i> e (D): <i>T. rubrum</i>	62
Figura 41: Western blot das SMases D de <i>A. flavus</i> e <i>G. occidentalis</i> evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. (C): controle, (M): marcador molecular em (kDa); (1): Linhagem T1 em <i>E. coli</i> , fração total de <i>A. flavus</i> ; (2) Linhagem T1 em <i>E. coli</i> , fração total de <i>G. occidentalis</i> ; (3) Linhagem T1 em <i>E. coli</i> , fração sobrenadante de <i>A. flavus</i> ; (4): Linhagem T1 em <i>E. coli</i> , fração sobrenadante de <i>G. occidentalis</i> . Todas em temperatura de 30 °C.	64

Sumário

1	Introdução	17
1.1	Esfingomielinases	17
1.2	Micro-organismos	21
1.3	Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)	24
1.4	Ensaio de cristalização	25
1.5	Catálise enzimática por ressonância magnética nuclear (RMN)	27
1.6	Ensaio de viabilidade celular	28
2	Justificativa	29
3	Objetivos	30
4	Materiais e Métodos	31
4.1	Análise das sequências primárias das SMases D	31
4.2	Transformação bacteriana	31
4.3	Padronização da expressão das SMase D	32
4.4	<i>Western blot</i>	33
4.5	Expressão da SMase D em larga escala	33
4.6	Purificação	33
4.7	Cristalização das proteínas	34
4.8	Catálise enzimática	34
4.9	Ensaio de viabilidade celular	34
4.10	Dicroísmo Circular	36
4.11	Análises estatísticas	37
5	Resultados e Discussão	38
5.1	Análise da sequência primária das SMases D	38
5.2	Alinhamento das sequências	38
5.3	Modelagem por homologia	40
5.4	Ensaio inicial da expressão em SMases D	42
5.5	Expressão em larga escala e purificação	45
5.6	Gel filtração (AKTA-purifier)	47
5.7	Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS)	52
5.8	Ensaio de viabilidade celular (MTT)	55
5.9	Catálise enzimática	60
5.10	Dicroísmo Circular	63

6	Conclusão	65
	Referências	66
	Apêndice A- Outros experimentos	71

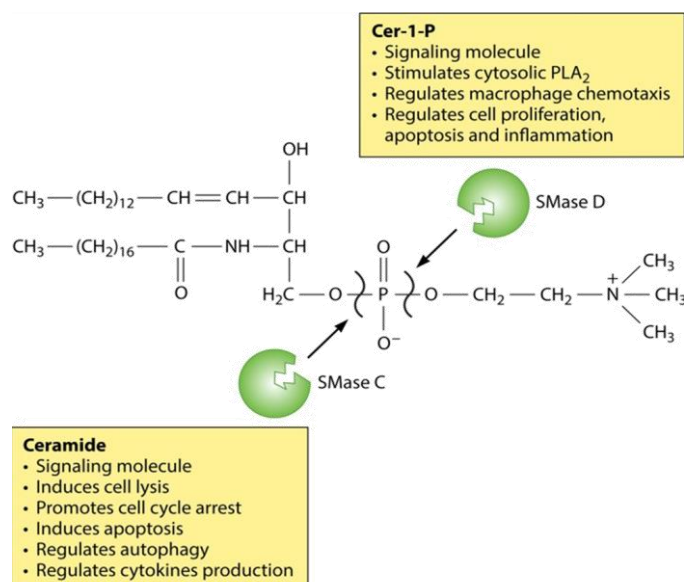
1 Introdução

1.1 Esfingomielinasas

As fosfolipases (PLs) são um grupo bastante diversificado de enzimas capazes de hidrolisar a ligação éster dos fosfolipídeos. São descritas como fatores de virulência ou de toxicidade, encontradas em diversos organismos. Existem quatro tipos de PLs: PLA, PLB, PLC e PLD (WAITE, 1996). As esfingomielinasas são um grupo de diéster hidrolases fosfóricas que clivam esfingomielinas em ceramida e fosforilcolina e por meio dessa clivagem ocorrem mudanças na fluidez, permeabilidade e cargas da membrana citoplasmática (GÖNI & ALONSO, 2002).

Em 1999, foi proposta por Samet e Barenholz, a divisão das esfingomielinasas em cinco grupos (1): a primeira a ser proposta foi a esfingomielinase ácida (aSMase) cuja atividade ótima é em pH ~5. (2): A esfingomielinase secretora (sSMase). (3): esfingomielinase neutra (nSMase) dependente de Mg^{2+} , que é uma proteína solúvel em bactérias e responsável por catalisar especificamente a clivagem hidrolítica da esfingomielina em ceramida e fosfocolina em pH ~7,4. (4): (nSMase) independente de Mg^{2+} e (5): esfingomielinase alcalina (bSMase) (CHATTERJEE, 1993; SAMET & BARENHOLZ, 1999).

Figura 1: Sítio de clivagem da esfingomielina que é reconhecido pelas SMases C e D e seus produtos de clivagem. SMase C originam os produtos ceramida e fosforilcolina, enquanto a SMase D ceramida-1- fosfato e colina.



Fonte: FLORES-DÍAZ et al., 2016.

Esfingomielinasas D (SMases D; EC 3.1.4.41) são fosfolipases, conhecidas também como esfingomielina fosfodiesterases D (LUCAS et al., 2010). Essas enzimas são responsáveis pela

clivagem hidrolítica das esfingomielinas ou de outros tipos de lisofosfolipídeos encontrados na membrana citoplasmática de seres eucariotos, para produzir colina e ceramida 1-fosfato ou colina e ácido lisofosfatídico (LPA), respectivamente (**Fig. 1**) (LEE & LYNCH, 2005). A SMase D é uma enzima dermonecrótica hemolítica que causa purgação e atua nas células endoteliais, provocando aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos e linfáticos, proporcionando desta maneira a infecção (ALVES et al., 2007; FONTAINE & BAIRD, 2008; SOUZA et al., 2011). SMases D também foram encontradas no veneno de aranhas marrons, sendo as responsáveis pela dermonecrose, insuficiência renal e morte (CHAIM et al., 2006).

Lee e Lynch (2005) propuseram que a SMase D seria um termo muito limitado e deveria ser tratada com o nome de PLD em algumas ocasiões, pois com uma maior gama de estudos, se descobriu que essa enzima é capaz de hidrolisar uma extensa quantidade de fosfolipídeos e não exclusivamente a esfingomielina (LEE & LYNCH, 2005).

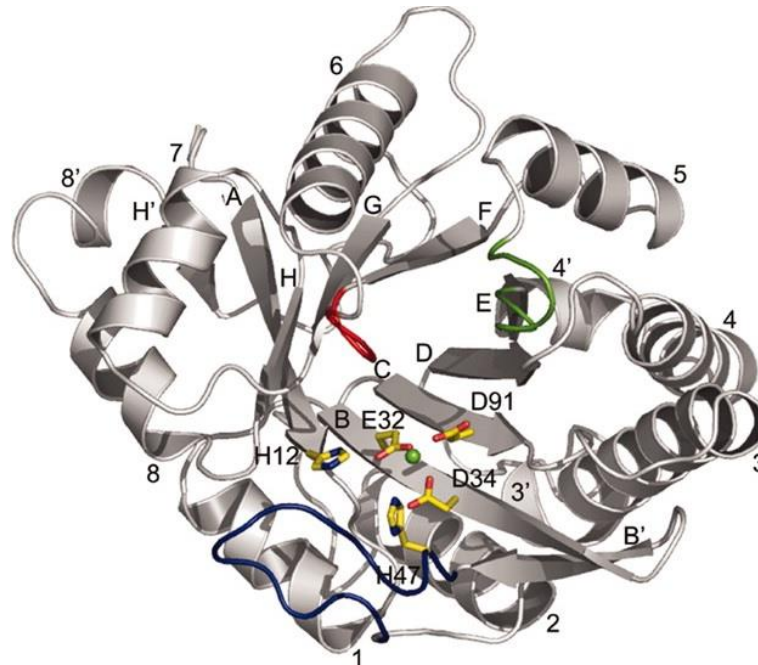
A primeira SMase D catalogada foi descoberta no veneno da família de aranhas *Sicariidae* como sendo a responsável pelos efeitos do loxoscelismo (GERTSCH, 1967). A produção de ceramida-1-fosfato é capaz de alterar a posição lipídica (camada interna e externa) e morfológica da membrana citoplasmática como a fluidez e permeabilidade e também está relacionada a alterações na regulação de respostas ao estresse, autofagia, produção de citocinas, fagocitose, migração de neutrófilos e liberação de mediadores inflamatórios. As SMases D são enzimas que não apresentam sequência semelhante (grau de homologia) às outras fosfolipases e também não apresentam a sequência conservada de resíduos de aminoácidos HKD, que caracteriza a superfamília PLD e por isso, não são capazes de agir sobre a fosfatidilcolina e outros glicerosfosfolipídeos (DIAS-LOPES et al., 2013; SUNG et al., 1997). Nos fungos a SMase D é capaz de regular algumas funções essenciais de desenvolvimento, como na esporulação de leveduras, tráfego vesicular e virulência para espécies patogênicas (ROSE et al., 1995; NEIMAN, 1998; HUBE et al., 2001).

As SMases D que são expressas por bactérias são consideradas fatores de virulência e durante o processo de infecção de diferentes hospedeiros, ao hidrolisar os lipídeos que compõem a membrana citoplasmática, causam a lise de suas células permitindo que ocorra colonização e disseminação bacteriana, proporcionando um ambiente com nutrientes para replicação e sobrevivência do patógeno. Esse processo de desestabilização celular está envolvido diretamente na destruição da célula e em infecções que destroem os tecidos, como por exemplo, gangrenas e erupções cutâneas nas células e tecidos do hospedeiro (SCHMIEL &

MILLER, 1999; TITBALL, 1998; SONGER, 1997). As bactérias mutantes patogênicas que não apresentam gene codificador da SMases D apresentam um sistema de virulência comprometido, o que corrobora para o papel de patogenicidade dessa enzima (FLORES-DIAS et al., 2016).

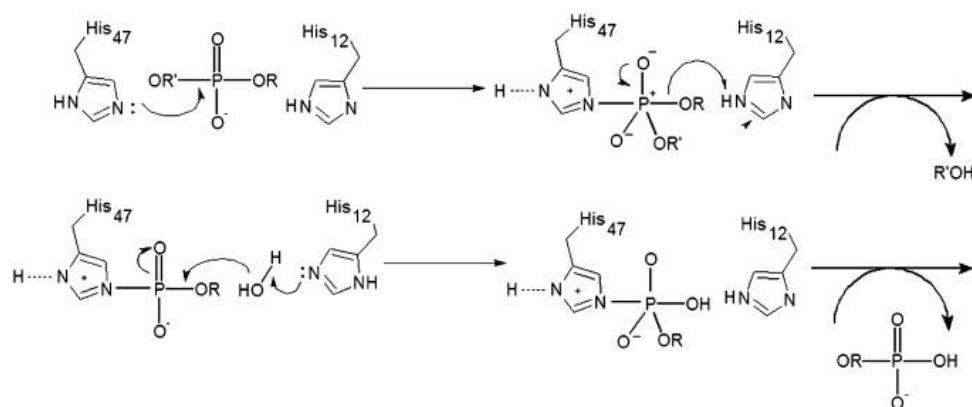
SMases D (30-35 kDa) apresentam um único tipo de domínio que apresentam dobramento “TIM (α/β) barrel” com inserção de folha- α e folhas- β . Em sua conformação há um loop catalítico, um loop flexível e um loop variável e ela ainda conta com vários outros curtos loops que cercam o centro ativo (**Fig. 2**) (DE ANDRADE et al., 2006; MURAKAMI et al., 2006). No sítio catalítico são encontrados dois resíduos de histidina (His12 e His47), que têm a função de hidrolisar os esfingolípídeos, por meio de um mecanismo ácido-base. Um íon Mg^{2+} é coordenado tetraedricamente por três resíduos (Glu32, Asp34, Asp91) e uma molécula de água, e tem a propriedade de estabilizar e coordenar o grupo fosfato do substrato durante o processo de hidrólise do lipídeo (MURAKAMI et al., 2005; MURAKAMI et al., 2006; DE SANTI FERRARA et al., 2009; ULLAH et al., 2011). Em 2006, Murakami e colaboradores mostraram que o resíduo His47 é o grupo nucleofílico que inicia a hidrólise ao atacar a ligação fosfodiéster do substrato, enquanto que o resíduo His12, ao doar um átomo de hidrogênio para o intermediário pentacoordenado, forma a colina, portanto a His12 desprotonada tira um próton da molécula de água e inicia um segundo ataque nucleofílico sobre o intermediário da reação e liberando a cermamida-1-fosfato (**Fig. 2 e 3**) (MURAKAMI et al., 2006).

Figura 2: Estrutura tridimensional de uma esfingomielinase evidenciando os principais resíduos de aminoácidos funcionais (His12, His47, Glu32, Asp34, Asp91) do sítio catalítico e o íon Mg^{2+} sendo representado pela esfera verde. O loop catalítico B (azul), loop variável E (verde) e o loop flexível F (vermelho). Adaptado de MURAKAMI et al, 2005.



Fonte: MURAKAMI et al., 2005.

Figura 3: Mecanismo da catálise das SMases D



Fonte: MURAKAMI et al., 2006.

As SMases D foram classificadas em I e II de acordo com suas informações bioquímicas, estruturais e alinhamento sequencial. A SMase D I é conhecida por apresentar apenas uma ponte dissulfeto e uma alça hidrofóbica. As SMases D do grupo II têm duas pontes dissulfeto, ligando a alça flexível com a alça catalítica. Esse último grupo pode ser subdividido em II – a, que são as proteínas capazes de hidrolisar a esfingomielina, e em II – b, que não conseguem desempenhar

esse papel e isso ocorre devido a alterações nos resíduos de aminoácidos G95N e P134Q, ao fazer com que a entrada do sítio catalítico fique hidrofílica e por uma mudança de cargas no grupo carboxilato quando existe a aproximação do substrato ao sítio catalítico (MURAKAMI et al., 2006).

1.2 Micro-organismos

Existem cerca de 100.000 espécies de fungos descritas e acredita-se que a maioria das espécies ainda não foi encontrada (KIRK et al, 2008). Os fungos são micro-organismos eucariotos, capazes de habitar diferentes tipos de ambientes como solo, matéria orgânica morta, água, e ar, podendo ser patógenos de plantas, animais e humanos. Eles podem beneficiar o desenvolvimento de plantas, serem essenciais nos processos de fermentação, na síntese de diversos tipos de antibióticos e na decomposição de matéria morta. Os fungos podem ser organizados em filamentosos, cogumelos e leveduras, sendo que os filamentosos e os cogumelos são multicelulares e as leveduras são unicelulares. Os fungos patogênicos acarretam doenças por meio de três mecanismos principais: respostas imunes inapropriadas (alergias), produção de toxinas e micoses (MADIGAN et al., 2006).

A micose é um dos mecanismos pelo qual os fungos ocasionam infecções sobre o corpo ou no interior de seus hospedeiros, podendo variar quanto o grau de gravidade e de tratamento. Elas são subdivididas em três categorias: as superficiais (fungo aparece nas camadas superficiais da pele, cabelo ou unha), subcutâneas (envolve camadas mais profundas da pele) e as sistêmicas (crescimento do fungo em órgãos internos do corpo). Os fungos que causam as micoses superficiais são conhecidos como dermatófitos (MADIGAN et al., 2006) e eles utilizam a queratina como fonte de nutriente. As doenças causadas por dermatófitos são decorrentes das enzimas que o fungo libera para digerir os tecidos queratinizados (GUPTA & SUMMERBELL, 2000; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995). Segundo a organização mundial da saúde (OMS), 25% da população mundial, é afetada por dermatófitos e há uma estimativa que desse total, 30%-70% não apresentam sintomas e a suscetibilidade aumenta à medida que o indivíduo envelhece (SEEBACHER et al., 2008).

Uma das espécies mais conhecidas de dermatófitos é o fungo *Trichophyton rubrum*, espécie patogênica, filamentosa e antropofílica que causa a doença popularmente conhecido como “pé de atleta”, que origina infecções principalmente nos pés (*tinea pedis*), mas também pode aparecer em outras superfícies úmidas da pele, bem como micose nas unhas (*tinea unguium*) e dermatofitoses na virilha, mãos e corpo (*tinea corporis*). São infecções de fácil transmissão

(esporos presentes em pisos de banheiros, vestiários, toalhas ou roupas) e geralmente o tratamento é de longa duração, o que pode estar relacionado à resistência do fungo sobre determinados medicamentos. A longa exposição a esses remédios ocasiona efeitos colaterais (MADIGAN et al., 2006; SEEBACHER et al., 2008).

Arcanobacterium haemolyticum é uma bactéria gram-positiva, com respiração aeróbica facultativa, apresenta forma de bacilo, mas conforme cresce, a forma de cocos se torna predominante e não há formação de endósporos. O crescimento é potencializado na presença de CO₂ e apresenta dois tipos diferentes de cepas: a suave que é encontrada predominantemente em feridas e a áspera que é encontrada predominante no trato respiratório (COLLINS et al., 1982; CARLSON et al., 1994). Essa bactéria foi descrita inicialmente como sendo do gênero *Corynebacterium* e a espécie sendo *C. haemolyticum*. De acordo com diferenças que essa espécie apresentou com relação ao seu gênero, após vários estudos e discussões, os cientistas entraram em comum acordo e realocaram essa bactéria no gênero *Arcanobacterium* e a classificaram como *Arcanobacterium haemolyticum* (COLLINS et al., 1982; MEHTA, 2003).

A. haemolyticum é um patógeno responsável pela faringite crônica hipertrófica (faringite exsudativa) e pela infecção dos tecidos moles. Afeta principalmente adolescentes e jovens adultos com idade entre 10 e 30 anos (MACKENZIE et al., 1995). Essa bactéria também foi encontrada em pessoas que apresentavam úlceras cutâneas, meningite, pneumonia, endocardite e infecções frequentes na garganta (CARLSON et al., 1994). Os principais sintomas dos pacientes que apresentam a *A. haemolyticum* são dor de garganta, febre, glândulas linfáticas inchadas e erupções cutâneas do tipo exantema (HEALTHY CHILDREN, 2015; MILLER et al., 1986). Existem vários casos nos quais o paciente é diagnosticado erroneamente com faringite causada por bactérias do tipo estreptococos, quando na verdade, o patógeno é *A. haemolyticum*. Isso ocorre, pois, as culturas com estreptococos são avaliadas em até 24h depois da inoculação, tempo esse em que as culturas de *A. haemolyticum* ainda não se desenvolveram o suficiente para serem identificadas e desse modo, a cultura pode ser discriminada (MIYAMOTO et al., 2015; TOMPKINS, 1983). *A. haemolyticum* produz um conjunto de toxinas extracelulares: hemolisina, esfingomielinase D (SMase D) e neuraminidase. Estudos apontam, que o aparecimento de infecções e manifestações cutâneas estão atreladas principalmente à SMase D (GASTON & ZUROWSKI, 1996; SOUCEK & SOUCKOVA, 1974).

A produção de SMase D contribui para que a infecção se propague do local pelo qual a bactéria penetrou, para locais secundários no hospedeiro (NAIRN et al., 1977). A SMase D de *A. haemolyticum*, é homóloga a de *C. pseudotuberculosis*, e ambas são responsáveis pela permeabilidade vascular e proliferação da infecção (CUEVAS & SONGER, 1993). Além dessas SMases D terem atividades bioquímicas e biológicas semelhantes, elas são responsáveis pela toxicidade no hospedeiro, como nas aranhas do gênero *Loxosceles*, visto que a SMase D também é encontrada em seus venenos apresentando essas mesmas funções (BERNHEIMER et al., 1985).

Austwichia chelonae, conhecida antigamente como *Dermatophilus chelonae* (HAMADA et al., 2010), é uma bactéria patogênica filamentosa, gram-positiva do gênero Actinobacteria e da família Dermatophilaceae. Tem uma diversidade de hospedeiros vertebrados, como por exemplo, mamíferos, aves e répteis (AUBIN, 2016). Essa bactéria é responsável por causar uma doença denominada de dermatofilose e seus principais sintomas são inflamações cutâneas, necrose da epiderme, abscessos subcutâneos, erupções escamosas e crostosas. Apresenta perdas econômicas significativas, pois seu tratamento requer o uso de antibióticos, cirurgia para a retirada do tecido afetado e diminuição na produção de leite, carne e lã, em seus hospedeiros (AUBIN, 2016; GEBREYOHANNES, 2013). Uma vez que essa bactéria apresenta como habitat solo e água, uma das maneiras de prevenção seria o tratamento prévio desses locais (MASTERS et al., 1995; GEBREYOHANNES, 2013). Altas temperaturas, pele úmida e umidade relativa do ambiente alta facilitam a entrada de *A. chelonae* no hospedeiro que acontece por meio de traumas e lesões na pele (GEBREYOHANNES, 2013).

O gênero *Corynebacterium* pertence ao grupo supra genérico dos Actinomycetes incluindo, também, os gêneros *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Nocardia* (HARD, 1969; PAULE et al., 2003; SONGER, 1988-1997) e apresenta considerável importância biológica, médica e veterinária. *C. pseudotuberculosis* é o agente etiológico da linfadenite caseosa (LC), doença infectocontagiosa crônica, que acomete diferentes grupos de animais no mundo inteiro, principalmente em áreas de produção de ovinos e caprinos, causando perdas econômicas significativas. A infecção está associada à redução da produção de lã, carne e leite, menor eficiência reprodutiva dos animais, condenação de carcaças e couros em abatedouros, gastos com tratamento e honorários veterinários. A doença se manifesta pela presença de necrose nas glândulas linfáticas, apresentando-se em duas formas: a LC externa ou superficial e a LC interna ou visceral (AZEVEDO, 1998; PEEL, 1997). Em humanos, a infecção por *C. pseudotuberculosis* é rara, sendo conhecidos cerca de 25 casos e um deles aconteceu em 1988,

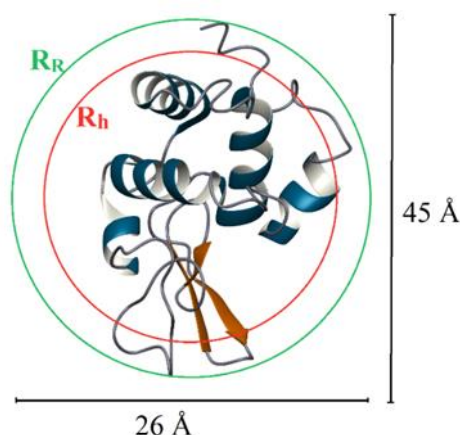
por meio da ingestão de carne de vaca crua e leite de cabra infectados com o patógeno (LIU, 2005; MILLS, 1997; PEEL et al., 1997).

O tratamento dos animais doentes somente com o uso de antibióticos sistêmicos, não é eficaz, sendo necessária a remoção cirúrgica dos linfonodos afetados, uma prática que financeiramente é inviável (BAIRD, 2007). As bactérias são sensíveis a diversos tipos de antibióticos *in vitro*, no entanto, eles não são capazes de penetrar na cápsula dos abscessos (OLSON, 2002). A drenagem e a remoção dos linfonodos superficiais atacados não eliminam 100% das bactérias e também não são viáveis quando os linfonodos e órgãos internos estão acometidos (Al-GAABARY, 2009). Além disso, esses métodos podem promover a contaminação do ambiente com o patógeno, uma vez que a quantidade de bactérias liberada por um único abscesso é capaz de contaminar todo o rebanho. Portanto, a melhor estratégia para combater a doença é a profilaxia (PIONTKOWSKI, 1998).

1.3 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

Na prática, as biomoléculas em solução encontram-se hidratadas e o raio calculado a partir do coeficiente de difusão oferece uma estimativa do tamanho aparente da partícula com sua camada de solvatação, denominado raio hidrodinâmico (R_h), portanto, os experimentos com DLS são capazes de mostrar a pureza estrutural da proteína e seu R_h estimado, aferir sua massa molecular (BERNE & PECORA, 1979) e ainda, diferenciar diversas populações da mesma proteína que pode se oligomerizar sob diversas formas. Quando uma partícula é iluminada pelo laser do DLS, a luz irá se espalhar em todas as direções, sendo possível analisar as flutuações da densidade de luz espalhada em um determinado ângulo e assim, obter informações sobre o movimento da partícula em análise. Por definição, o DLS mede o raio de uma esfera rígida hipotética, mas este conceito é de certa forma problemático para análises de biomoléculas, como por exemplo, proteínas, pois essas moléculas não se enquadram exatamente nessas características, e na prática, a maioria das macromoléculas em solução são não-esféricas e possuem um certo grau de flexibilidade quando solvatadas. Uma comparação entre o raio hidrodinâmico e outros tipos de raios pode ser demonstrada utilizando lisozima como um exemplo (**Fig. 4**). A partir da estrutura cristalográfica, a lisozima pode ser descrita como uma elipsóide de 26 x 45 Å e seu R_R de 45 Å é o raio estabelecido pela rotação da proteína sobre o seu centro geométrico, no entanto possui um R_h experimental de 1,9 nm (PARMAR & MUSCHOL, 2009).

Figura 4: Comparação entre o R_R e o R_h da Lisozima.



Fonte: CUETO, 2015.

Variações no pH, salinidade, concentração proteica e adições de possíveis inibidores foram avaliados por meio de ensaios de DLS a fim de obter informações sobre a polidispersividade e a presença de agregados das amostras de SMase D que foram previamente centrifugadas por 60 min a 13.000 x g a 10 °C. Em todas as análises foram realizadas 20 aquisições de 50 segundos a 25 °C.

A dispersividade das amostras proteicas centrifugadas foi analisada por espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS), com a finalidade de encontrar condições em que as proteínas SMases D concentrada não estejam agregadas. Inicialmente as amostras foram analisadas no aparelho Zetasizer Nano ZS90 (Malvern), por meio de um ciclo com 20 varreduras de 50 segundos cada.

1.4 Ensaios de cristalização

O processo de formação de cristais pode ocorrer de maneira natural ou artificial. Para que a cristalização seja bem sucedida, é necessário que a amostra a ser cristalizada esteja com alto grau de pureza. Caso o processo de purificação não seja bem executado, os cristais serão geralmente pequenos e mal formados. Um cristal é um arranjo tridimensional (3D) de proteínas dispostas de maneira regular e para a obtenção da molécula cristalina, a partir de uma solução proteica, é necessário que haja uma diminuição da solubilidade das moléculas, no entanto, essa redução da solubilidade, geralmente forma um precipitado irregular, sendo assim, são necessárias condições de cristalização apropriadas (PECHKOVA et al., 2008; PECHKOVA & NICOLINI, 2002). A cristalização é um processo demorado, desafiador e de baixa probabilidade, entretanto, é um passo fundamental para elucidar estruturas tridimensionais de macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, complexo proteína/ligante) possibilitando

determinar sua composição, funções e interações com outras moléculas (PECHKOVA et al., 2008; PECHKOVA & NICOLINI, 2002). Por meio de uma separação sólido-líquida durante um processo químico ocorre a formação de solução supersaturada, ou seja, o soluto da solução se separa do solvente de modo a formar uma rede cristalina e que posteriormente, dá origem aos cristais sólidos (DESSAU & MODIS, 2011).

O processo de cristalização é dependente de diversas interações proteína-proteína. Existem diversos fatores químicos e físicos fundamentais envolvidos nesse processo, como a alta pureza e concentração da proteína, além de tampão, precipitante, pH e temperatura ideal, combinados com uma solução altamente saturada sem a presença de precipitados de proteína e agregados. (DESSAU & MODIS, 2011; GARCÍA-RUÍZ, 2003). Os precipitantes utilizados são sais inorgânicos e compostos orgânicos que aumentam a interação proteína-proteína e assim, promovem a formação de cristais (MCPHERSON, 1999; DURBIN & FEHER, 1996).

A técnica de cristalização pode ser dividida em: nucleação (zona lábil), crescimento (zona metaestável) e fim do crescimento (MCPHERSON, 1999). Na nucleação ocorre agregação dos monômeros, ou estados oligoméricos estáveis em solução até obterem um determinado tamanho para que o crescimento possa começar e para essa etapa acontecer, é necessário um estado de supersaturação. O crescimento é quando ocorre o aumento do cristal, ou seja, a superfície do cristal precisa ser capaz de incorporar, na rede cristalina, as unidades de crescimento que chegam da solução (KEEL, 2004). O fim do crescimento é determinado quando o cristal não pode mais crescer (defeitos do crescimento, contaminação das faces, envelhecimento da molécula). A velocidade de formação de cristais aumenta com a supersaturação e a nucleação demanda um estado de supersaturação maior do que aquele da fase de crescimento (AZEVEDO, 2004). Existem diferentes técnicas utilizadas para que a proteína passe pelo processo de cristalização: difusão por vapor, diálise, *batch* e difusão de interface. Todas têm como objetivo levar a solução de macromolécula biológica a um estado de supersaturação (AZEVEDO, 2004). A técnica mais utilizada é a difusão por vapor que pode ser subdividida em duas a “*hanging drops*” e a “*sitting drops*”. O método consiste na difusão isotérmica do solvente sob a forma de vapor, de uma solução menos concentrada em precipitante e contendo proteína, para uma solução mais concentrada em precipitante no poço. Isto aumenta a concentração do agente precipitante e de proteína na gota.

1.5 Catálise enzimática por ressonância magnética nuclear (RMN)

Para um organismo sobreviver, ele deve ser capaz de catalisar muitas reações químicas de maneira eficiente e seletiva. As enzimas têm um papel fundamental no processo de catálise, apresentando alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas e são capazes de funcionar em soluções aquosas de uma maneira extraordinária sob condições específicas de pH e temperatura. Todas as enzimas são proteínas, com exceção de pequenas moléculas de RNA que também apresentam capacidade catalítica (NELSON & COX, 2011). A atividade catalítica de uma enzima depende de sua integridade conformacional nativa. Há enzimas que necessitam apenas de seus resíduos de aminoácidos como grupo químico, já outras precisam de um cofator, que pode ser desde íons inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , uma molécula orgânica complexa ou uma molécula metalorgânica, conhecida como coenzima. As SMases D necessitam de Mg^{2+} . O sítio ativo é composto por resíduos de aminoácidos e apresenta uma cavidade com forma definida, cuja função é o reconhecimento e ligação do seu substrato, sendo assim, para determinado composto ser aceito como substrato, ele deve apresentar uma estrutura espacial capaz de se alojar no sítio ativo, bem como grupos químicos que apresentam a capacidade de se ligar com os radicais presentes. Os catalisadores afetam somente a velocidade da reação e não o equilíbrio dela e a velocidade é aumentada quando há diminuição na energia de ativação (NELSON & COX, 2011).

As enzimas podem interagir com agentes moleculares inibidores que são capazes de interferir na catálise, diminuindo ou interrompendo a formação de produtos das reações enzimáticas ao se ligar à enzima, ao complexo enzima/substrato ou simultaneamente em ambos. Estudos com inibidores vêm fornecendo informações valiosas acerca dos mecanismos enzimáticos e ajudado na definição de vias metabólicas. Existem duas classes principais de inibidores: os que são reversíveis e os que são irreversíveis. A inibição reversível pode ser competitiva, quando o inibidor se liga no sítio ativo da enzima e assim impede a ligação do substrato e esse tipo de inibidor deve ser uma molécula semelhante ao substrato e que seja capaz de combinar com a enzima para formar o complexo enzima/inibidor. Essa ligação pode ser reversível e assim a competição pode ser tornar favorável ao substrato, pela adição de mais substrato, portanto, quando há uma concentração maior de substrato do que de inibidor, a probabilidade do inibidor se ligar à enzima é pequena. Já os inibidores irreversíveis, reagem quimicamente com a enzima e assim, ocorre uma inativação definitiva: eles se combinam com o grupo funcional da enzima, destroem ou formam associações covalentes estáveis (NELSON & COX, 2011).

1.6 Ensaios de viabilidade celular

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e é composta pela epiderme e a derme. A epiderme é composta principalmente por células queratinócitas que produzem uma proteína altamente resistente e impermeável denominada queratina, funcionando como barreira de proteção à entrada de hospedeiros e a respostas imunológicas e inflamatórias (BARONI et al., 2012; HARIEL et al., 2013). Além disso, produzem vários tipos de mediadores como as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e metalonoproteases (MMPs) (BOUWSTRA et al., 2006). As MMPs são classificadas como endopeptidases que apresentam zinco em seu sítio ativo, podendo estar ancoradas na superfície da célula ou serem secretadas na forma de pró-enzimas (BORDEN & RA, 1997). Elas são responsáveis por inúmeros processos fisiológicos por meio da digestão da matrix extracelular, a maioria, no entanto não é expressa no tecido em latência, mas sim quando há processos de reparo ou remodelação de tecidos doentes ou inflamados (RA & PARKS, 2007).

Com o avanço da tecnologia e a necessidade da obtenção de resultados rápidos, preservação do bem-estar animal, muitos pesquisadores optam por realizar teste *in vitro* de forma preliminar. Ensaios de viabilidade celular são utilizados para a seleção de fármacos ou moléculas que inibem a toxicidade e a proliferação celular desenfreada com a finalidade de avaliar quantas células permanecem viáveis após os experimentos (RISS et al., 2013). Um dos ensaios mais utilizados é o teste de MTT {brometo de [3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difenil tetrazolium]}, em que o anel de tetrazólio, um componente amarelo e solúvel, é fragmentado em células vivas e transformado em formazan, um composto que apresenta a coloração roxa e é insolúvel, essa característica não evidenciada em células vivas, ou seja, MTT é capaz de clivar a enzima hidrogenase succínica das mitocôndrias, indicando a viabilidade da célula (MOSMANN, 1983).

Os ensaios de MTT são realizados em diferentes tipos de culturas celulares. As células da linhagem de queratinócitos humano HaCaT são um dos exemplos utilizados. Os queratinócitos eram frequentemente usados como modelo de estudo *in vitro*, no entanto, apresentavam algumas restrições tais como uso de fatores suplementares de crescimento e pouca vida útil da cultura celular (ALBANESI, 2005). Visando sanar esses problemas, o uso de células da linhagem HaCaT foi intensificado, pois é uma célula que consegue suprir as mesmas funções dos queratinócitos, tem uma vida útil maior, não é tumorigênica, apresenta uma morfogênese normal e consegue alterar entre estado estratificado e basal (SCHURER et al., 1993; BOUKAMP et al., 1988).

2 Justificativa

Os micro-organismos *Austwickia chelonae*, *Trichophyton rubrum*, *Arcanobacterium haemolyticum* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* têm em comum a capacidade de gerar doenças (MADIGAN et al., 2006; HEALTHY CHILDREN, 2015; MILLER et al., 1986;) e todos codificam a enzima SMase D como fator de virulência. As membranas citoplasmáticas de eucariotos e procariotos são constituídas basicamente lipídeos e proteínas. Muitos micro-organismos patogênicos utilizam algumas enzimas hidrolíticas, como por exemplo, as esfingomielinases, capazes de destruir ou desorganizar os componentes de membrana citoplasmática da célula, promovendo alterações ou rupturas dessas estruturas (SALYERS & WITT, 1994). Desse modo, existem várias evidências que apontam que as esfingomielinases de diferentes tipos de micro-organismos são um tipo de fator de virulência capaz de danificar as células do hospedeiro (SALYERS & WITT, 1994) permitindo a proliferação celular. A SMase D também é responsável por permitir que a bactéria escape do sistema de fagocitário e assim, causar a morte da célula hospedeira por necrose.

Vários micro-organismos patogênicos, apresentam a SMase D como um dos agentes responsáveis por seus fatores de virulência e isso está diretamente relacionado a prejuízos na agricultura, pecuária e é um problema de saúde pública mundial. Não existem trabalhos que correlacionam a atividade enzimática de SMases D de diferentes organismos com suas peculiaridades em suas estruturas tridimensionais. Se estabelecida esta correlação, é possível, futuramente, desenhar fármacos que inibam a atividade da SMase D com alta especificidade.

3 Objetivos

Os objetivos gerais são a expressão e purificação das SMases D de *Austwickia chelonae*, *Trichophyton rubrum*, *Arcanobacterium haemolyticum* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* para relacionar ensaios de viabilidade celular na presença dessas enzimas com as suas atividades catalíticas.

Os objetivos específicos são:

- Estabelecimento de protocolos de expressão e purificação das SMases D em larga escala;
- Cristalização em diferentes ensaios;
- Análise da atividade enzimática monitorada por ressonância magnética nuclear;
- Avaliar a influência das SMases D isoladas e também na presença seus possíveis inibidores tetraciclina, lapachol e doxiciclina em ensaios de viabilidade celular de células da linhagem HaCaT.

4 Materiais e Métodos

4.1 Análise das sequências primárias das SMases D

O ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, <http://ca.expasy.org/>) é um servidor de biologia molecular que possui acesso a sequências de resíduos de aminoácidos de diferentes organismos e assim sendo possível análises de identificação e caracterização da proteína, predição de estrutura secundária, topologia, etc. O programa ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) foi utilizado para análise da sequência primária das SMases D. A análise da identidade entre as sequências alvos foram realizadas utilizando *Sequence Identity And Similarity* (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

4.2 Transformação bacteriana

Vetores pET-28a (+) contendo os genes que codificam as SMases D de *Austwickia chelonae*, *Trichophyton rubrum*, *Arcanobacterium haemolyticum* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* foram sintetizados pela empresa *GenScript* com a adição da sequência codificadora Histag N- terminal e um sítio de clivagem para TEV protease. Diferentes linhagens bacterianas competentes foram transformadas pelo método de choque de térmico. Posteriormente, as bactérias foram isoladas em meio sólido seletivo (LB + kanamicina 30 µg/ml) e após 16 h as colônias foram avaliadas em testes de expressão.

Abaixo estão representadas as sequências de aminoácidos que codificam as SMases D utilizadas neste estudo, com destaque para a cauda de histidina em amarelo e sítio de clivagem para TEV protease em cinza.

SMase D de *Austwickia chelonae*

MGSSHHHHHHENLYFQGPTAPAPSHQRPIYAIAHRVLTGGVDDALKMGYNALVD
LTAWKAGWYADHDGTLTSRGDTVEPMFKRIAQNRKDGRNVSFVWLDIKNPDFCDS
QVPAWKHCSVAHLQSKAREILEPVGIKVLYGFYKTVGGGGWKTITQSLNQNEAVSV
SGSYGSVKQQFDEHGKHVPPKQRVADYGLFNIVTGFGDCGDKANKTCNELRRSSLA
RDAGEFGRTFAWTIAKNQPDHVGLLADAHVDGMITGFKATHFYHSHTEQALKSV
TDWVGKHPSTHRMATNDDKPW

SMase D de *Arcanobacterium haemolyticum*

MGSSHHHHHHENLYFQGGEQPTTGNRPVYAIAHRVLTQSVDDAIKIGANALEIDFT
AWRRGWADHDGLPTSAGDTAEDILKYIAQKRREGNNITFVWFDIKNPDYCKDQNS
VCSITKLRLDLARQTIEQEGVRALFGFYKTVGGVGWNTIANNLNDKEAVALSGRKDDI
MKDFKQYENKIKPQQRVADNGYYNLSYGFGGCYRDENQTCQQLRLAGEERKKGNL
GKTFGWTVSTGQEYLAADLLNKA EVDGMIFGFKTTYFYDHADTRNAFAGIKNWVD
AHQGTHHMATN KDIPW

SMase D de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

MGSSHHHHHHENLYFQGSSGLVPRGSHMASPASTANRPVYAIAHRVLTQGVDDAV
AIGANALEIDFTAWGRGWADHDGIPTSAGATAEEIFKHIADKRKQGANITFTWLDIKN
PDYCRDARSVCSINALRDLARKYLEPAGVRVLYGFYKTVGGPAWKTITADLRDGEA
VALSGPAQDVLNDFARSENKILTKQKIADYGYYNINQGFNCYGTWNRTCDQLRKS
SEARDQGKLGKTFGWTIATGQDARVNDLLGKANVDGLIFGFKITHFYRHADTENSFK
AIKRWVDKHSATHHLATVADNPW

SMase D de *Trichophyton rubrum*

MGSSHHHHHHENLYFQGAPTWDTPNFTSPSNFTSKPGNEASPFWLIGHRVLTGKGV
RAALGHGANALEVDITGWNGWYGDHDGLPSSAGDKVADLFDEIAYRRRQGAQVS
FVWLDLKNPDFNKNGVNIVSLMTLCREKLEPAGVRVLFYSSQTSGHAFRFVKQVL
NENEAIGIDGSFEPVEKDFEKNIRVEKRVFSSGLFNPDFNFGTCQDRASGVCTQLRE
GKESHKFGKVFGWTVSSYTRKDHVYKMMEVGVDGLIYGFVASHYYNHKDIRQTIRT
IRGWLDEHRDTHRLATNDDNPWSMSSRKSS

4.3 Padronização da expressão das SMase D

Visando encontrar a condição ideal de expressão da proteína SMase D, para obtenção do maior rendimento de proteína solúvel pura/Litro de cultura, inicialmente 5 mL de cada pré inóculo, foram transferidos para um novo tubo contendo 100 mL de meio líquido seletivo (LB + kanamicina 30 µg/mL). A amostra foi mantida sob agitação e aeração até atingir a densidade ótica (OD_{600 nm}) entre 0,4 e 0,6 para indução da expressão com IPTG. A absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro –*Spectronic Genesys 2*. A indução da expressão foi feita com IPTG em diferentes concentrações (0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mM) e sob diferentes temperaturas (20, 30 e 37 °C) a fim de obter proteínas na fração solúvel após a sonicação. Após 4 e 16h de

indução, amostras coletadas foram centrifugadas a 5000 x g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em tampão de lise celular com variações no pH, concentração salina, aditivos (como, por exemplo, diferentes íons isolados ou combinados, diferentes concentrações de glicerol, DTT, etc).

4.4 Western blot

Após a sonicação seguida de centrifugação a 17000 x g por 30 min, alíquotas contendo 10 microlitros de sobrenadante e 5 microlitros de cultura induzida foram misturadas com tampão de amostra (1:1) e aplicadas em gel SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um eletrotransferidor (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad*) operando sob voltagem constante (100V) por 1 hora. Foi utilizado o tampão de transferência Tris-Glicina (Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M) contendo metanol 20%. A membrana foi incubada com antissoro monoclonal Anti-poli-histidina produzido em camundongo (SIGMA) e antissoro anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina (SIGMA) diluído 1:30.000. A detecção da reação antígeno/anti-corpo foi feita com mistura de BCIP/NBT (5-bromo- 4 chloro-3- indolyl-phosphate/nitro-bluetetrazolium).

4.5 Expressão da SMase D em larga escala

A proteína foi expressa adicionando 10 mL de pré inóculo em 1 L de meio seletivo LB. Após a expressão, a cultura foi centrifugada a 8000 x g e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em tampão de lise celular. A solução foi submetida a 5 pulsos de 45 segundos a 300 W em sonificador (*Marconi - MA 103*) para lise celular.

4.6 Purificação

A coluna de purificação (Bio-Rad) contendo a resina de (Ni-NTA) (*Ge healthcare*) foi primeiramente pré-equilibrada com o mesmo tampão utilizado para lisar as células. Em seguida, o sobrenadante do lisado celular obtido após centrifugação a 15000 x g por 40 minutos foi transferido para coluna contendo resina Níquel Sepharose para que as proteínas (His-tagged) fossem adsorvidas. Após a adsorção, a resina foi lavada utilizando tampão de lavagem com quantidades crescentes de imidazol para remover contaminantes adsorvidos inespecificamente na resina. Por fim, as proteínas foram eluídas utilizando tampão de eluição contendo altas concentrações de imidazol. Os resultados da purificação foram analisados em ensaio de eletroforese em gel de policrilamida. As mesmas amostras das SMases D, concentradas após a

purificação por cromatografia de afinidade, foram submetidas à gel filtração em coluna Superdex G75 10/300 (GE) pelo sistema AKTA-purifier.

Para verificação do sucesso das etapas de purificação, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), possibilitando a separação de proteínas de acordo com a massa molecular. As proteínas foram desnaturadas por fervura (3 minutos a 100 °C) em tampão de amostra (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, contendo SDS 4%, glicerol 20%, 2-ME 10% e azul de bromofenol 1,0 mM). A eletroforese foi conduzida por aproximadamente 90 minutos a 100 V no aparelho Protean II. Após esse procedimento, o gel foi fixado e corado em mistura contendo metanol, água, ácido acético (50:50:10) e Comassie Blue 0,25% e posteriormente descorado com metanol e água (1:1) para visualização do resultado.

4.7 Cristalização das proteínas

Os *screenings* iniciais das condições de cristalização foram realizados pelo método de difusão de vapor por gota sentada (“*sitting drop*”) utilizando o robô Janus. A temperatura de incubação foi de 20 °C. Os kits utilizados foram: Crystal Screen 1 e 2 (Hampton), JSCG+ (Qiagen), PactSuite 2 (Qiagen), Morpheus (Molecular Dimensions) e PEG/Ion 1 e 2 (Hampton) e para cada uma das 96 condições de cada Kit foram aplicadas soluções de proteínas concentradas e soluções de precipitante na proporção 1:1, 1:2 e 2:1, totalizando 192 condições por kit. Os cristais foram utilizados pelo nosso grupo de pesquisa para experimentos de difração de raios X para que possamos resolver as estruturas tridimensionais.

4.8 Catálise enzimática

A fim de monitorar a catálise das SMases D dos diferentes grupos de organismos e a interação com possíveis inibidores, foi utilizada a espectroscopia de RMN. Todos os experimentos foram realizados em espectrômetro *Bruker AVANCE III HD* (Bruker, Alemanha) operando a 600 MHz por 1 h. A catálise aconteceu por RMN-¹H com o 1 mM do substrato ácido lisofosfatidilcolina (LPC) juntamente com 5 mg/mL de SMases D. As análises dos 23 espectros formados em aproximadamente 2 horas foram realizadas em triplicata. Para obtenção dos dados gerados a partir dos espectros, foi utilizado o software *TopSpin™* da *Brucker*.

4.9 Ensaios de viabilidade celular

Foram realizados ensaios de viabilidade celular das SMases D em células da linhagem HaCaT (linhagem não tumoral de queratinócito humano imortalizado) na presença dos possíveis inibidores tetraciclina, lapachol e doxíciclina.

Nome IUPAC da Tetraciclina:

(4S,6S,12aS)-4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,6,10,12,12a-pentahydroxy-6-methyl-1,11-dioxonaphthacene-2-carboxamide

Nome IUPAC do Lapachol:

4-Hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)naphthalene-1,2-dione

Nome IUPAC da Doxíciclina:

(4S,4aR,5S,5aR,6R,12aR)-4-(dimethylamino)-1,5,10,11,12a-pentahydroxy-6-methyl-3,12-dioxo-4a,5,5a,6-tetrahydro-4H-tetracene-2-carboxamide

As células foram cultivadas em meio modificado DMEM (*Gibcoby Life Technologies, Grand Island, NY*) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor (FBS), 50 U/ml de penicilina e 0,05 mg/ml de estreptomicina. As células foram incubadas a 37 °C durante 6 horas em estufa com 5% de CO₂. Para a semeadura celular, as células HaCaT foram cultivadas em meio celular sem o soro. A fim de evitar a contaminação celular, um filtro (Millipore 0,22 µm) foi utilizado para filtrar o meio de cultura.

Para os testes de citotoxicidade, o meio celular contendo somente as SMases D, o antibiótico ou as SMases D, juntamente, com o antibiótico, foram cultivadas na quantidade de 0,75 x 10⁴ células por poço em placas de 96 orifícios. Após 16 h, o meio de cultura DMEM foi trocado por meio novo contendo diferentes concentrações dos compostos em um volume total de 100 µL por poço. Após 24, 48 e 72 h de incubação a citotoxicidade foi avaliada por meio de ensaio MTT [3- (4,5-dimethylthiazol- 2yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide] de viabilidade celular. Além disso, como controle experimental, foram utilizadas células incubadas com meio de cultura livre de compostos.

Ao fim de cada tempo experimental, o volume contido em cada orifício foi substituído por 100 µL de solução de MTT previamente dissolvido em meio DMEM (SIGMA) e a placa foi incubada por 30 minutos em estufa úmida enriquecida com CO₂ a 37 °C. Ao fim da incubação, toda a solução de MTT foi retirada de cada poço e substituída por 100 µL de DMSO. A placa foi agitada por 5 minutos com rotação de 100 x g para a dissolução dos cristais de formazan e a leitura foi realizada em leitor de placas em comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas em dois eventos independentes e o limite mínimo de viabilidade celular aceito para prosseguir para a próxima etapa foi de 80%. Posteriormente, foi feito o ajuste

fino. Para isso, foram avaliadas concentrações situadas entre a concentração não tóxica e a que apresentou o início de toxicidade acima do valor estabelecido, utilizando os dados obtidos na triagem inicial para estabelecer esse intervalo. Essa etapa também foi feita em triplicatas e em dois eventos independentes.

As SMses D de *C. pseudotuberculosis*, *A. haemolyticum* e *A. chelonae* estavam na concentração estoque de 4 mg/ml, para os experimentos e as concentrações utilizadas foram 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg durante 24, 48 e 72 horas. Os inibidores testados foram tetraciclina, lapachol e doxiciclina, que estavam na concentração estoque de 112 mM e nos experimentos, as concentrações utilizadas foram 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg durante 24, 48, 72 e 96 horas. Aquelas proteínas que apresentaram uma viabilidade celular menor que 100% quando comparada com seu controle, foram testadas posteriormente com os inibidores lapachol, tetraciclina e doxiciclina.

4.10 Dicroísmo Circular

O Dicroísmo circular (CD) foi obtido à temperatura ambiente no espectro polarímetro Jasco J-815 (Jasco, USA) equipado com um sistema Peltier para controle de temperatura, sendo utilizada uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 0,5 mm, foi utilizado para estimar a porcentagem da estrutura secundária e a qualidade da proteína. Os espectros de CD-UV *far* da proteína foram coletados no intervalo de 260-190 nm com velocidade de varredura de 50 nm/min, tempo de resposta de 1,0 segundos, largura da banda espectral de 1,0 nm, resolução espectral de 0,2 nm e número de acumulações igual a 10. A concentração das proteínas para a obtenção dos espectros foi de 8,2 µM para *T. rubrum*, 3 µM, *A. haemolyticum*, 3,8 µM *A. chelonae* e 3 µM *C. pseudotuberculosis* diluídas em tampão de 5 mM de fosfato, 50 mM de fluoreto de sódio e pH 7,4. Todos os espectros de CD foram registrados como miligraus (Θ) e, em seguida, foram expressos em termos de elipticidade molar [Θ] em unidades de deg.cm².dmol⁻¹ a seguinte expressão:

$$[\Theta] = \frac{\theta(mdeg)}{10 \cdot [P] \cdot l \cdot n}$$

Sendo [P] a concentração molar da proteína, *n* o número de resíduos de aminoácidos e *l* o caminho óptico da cubeta (cm). A porcentagem das estruturas secundárias foi estimada pelo software CONTINLL do pacote de programas CDpro, usando o conjunto de referências de proteínas SMP56 (SOUCEK & SOUCKOVA, 2000).

4.11 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 6*. A diferença significativa na comparação entre as células HaCaT tratadas com *A. chelonae*, *C. pseudotuberculosis* e *A. haemoliticum* em termos de taxa de citotoxicidade e para a comparação múltipla entre os diferentes tratamentos com as SMases D utilizou-se o teste Dunnet, pois apresentaram dados paramétricos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes neste estudo.

5 Resultados e Discussão

5.1 Análise da sequência primária das SMases D

A tabela 1 apresenta a quantidade de aminoácidos totais da sequência codificadas pelos genes sintéticos, massa molecular (Da) e ponto isoelétrico teórico (pI) de cada SMase D. A figura 5 evidencia os resíduos aminoácidos que compõe a sequência de cada SMase D que foi expressa em sistema procariótico neste estudo, destacando os resíduos de aminoácidos mais representativos em cada sequência.

O conhecimento do pI de cada proteína trouxe informações para que se pudesse estabelecer os pHs dos tampões de purificação. Foram evitados tampões com valores iguais de pH e pI, uma vez que nos casos em que pIs apresentam valores iguais ou muito próximos do pH da solução, as forças de interação com o solvente são mínimas e desse modo elas vão formando aglomerados maiores e tendem a se precipitar (NELSON, 2011). Se o pH for maior que o pI a carga líquida é negativa e se for menor é positiva. Dessa forma, conhecer o valor de pI é importante para a solubilidade das proteínas e a presença da carga negativa ou positiva é quem determina a interação com o meio aquoso e consequentemente estabelece um estado de repulsão entre as moléculas, aumentando ou diminuindo a interação com o solvente.

Tabela 1 Dados das SMases D obtidos em análise pelo ProtParam.

Proteínas	Quantidade de Aminoácidos	Massa Molecular	Ponto Isoelétrico teórico
<i>A. chelonae</i>	304	33788,77 Da	8.26
<i>A. haemolitycum</i>	296	33662,43 Da	6.63
<i>C. pseudotuberculosis</i>	306	33814,78 Da	8.76
<i>T. rubrum</i>	313	35404,41 Da	7.30

5.2 Alinhamento das sequências

A identidade entre as sequências foi avaliada pelo SIAS (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) e demonstrou valores de identidade baixos entre as sequências alvo, como demonstra a figura 5.

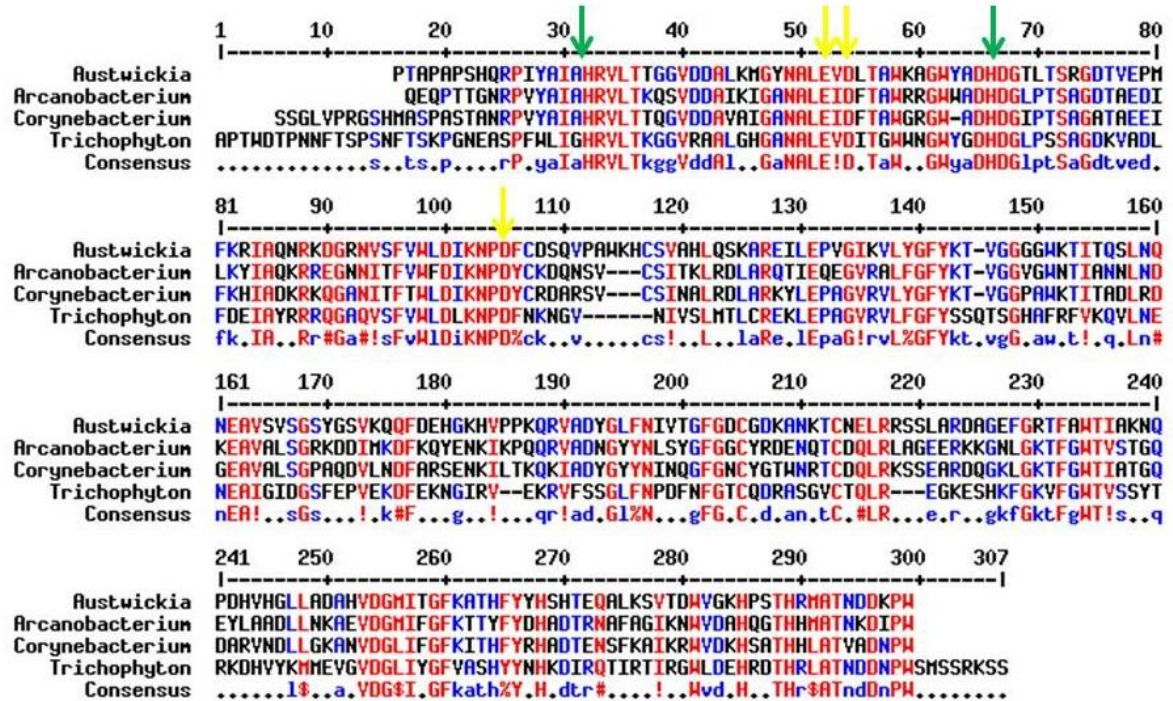
Figura 5: Identidade entre as sequências primárias das SMases D de *C. pseudotuberculosis*, *T. rubrum*, *A. haemolyticum* e *A. chelonae*.

IDENTIDADE				
<i>Austwickia_chelonae</i>	100%			
<i>Arcanobacterium_haemolyticum</i>	6.81%	100%		
<i>Corynebacterium_pseudotuberculosis</i>	4.49%	4.84%	100%	
<i>Trichophyton_rubrum</i>	4.72%	5.4%	3.71%	100%
	<i>Austwickia_chelonae</i>	<i>Arcanobacterium_haemolyticum</i>	<i>Corynebacterium_pseudotuberculosis</i>	<i>Trichophyton_rubrum</i>
ESTATÍSTICA				
min	= 3.71			
max	= 6.81			
mean	= 5.0575			

Fonte: Adaptado SIAS.

Embora a identidade entre os organismos seja baixa, é possível que essas enzimas compartilhem uma alta homologia estrutural, uma vez que todas as SMases conhecidas apresentam a estrutura em forma de barril conhecida classicamente como *TIM barrel*. Esse barril é caracterizado por um dobramento proteico conservado entre muitas enzimas e que consiste em oito hélices α e oito fitas β paralelas que se alternam ao longo do esqueleto peptídico. A análise da sequência primária também foi realizada por multialinhamento. O alinhamento de sequências é feito com duas ou mais proteínas e tem como intuito o conhecimento das igualdades, similaridades e diferenças entre elas, posição dos resíduos de aminoácidos, conhecer o local onde se encontra o sítio de clivagem, sítio ativo e os resíduos de aminoácidos e a localização da cauda de histidina, se houver. Ao se alinhar sequências, os resíduos de aminoácidos que compõem as proteínas estarão alinhados de acordo com os resíduos conservados e não conservados, ou seja, os que sofreram ou não modificações com base em um ancestral comum, portanto, outra finalidade dessa ferramenta é a construção de árvores filogenéticas. As sequências das SMases D de *C. pseudotuberculosis*, *T. rubrum*, *A. haemolyticum* e *A. chelonae* foram construídas no MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multali/>), no qual o alinhamento é global, ou seja, é feito ao longo de toda a extensão da sequência. Ao alinhar as quatro diferentes SMases D, foi possível identificar as duas histidinas do sítio catalítico dessas enzimas (His32 e His66) e os 3 resíduos que coordenam o íon Mg^{2+} (Glu52, Asp54, Asp106) (MURAKAMI, et al 2005 e 2006) (**Fig.6**).

Figura 6: Alinhamento das sequencias das SMases D de *C. pseudotuberculosis*, *T. rubrum*, *A. haemolyticum* e *A. chelonae*. As setas em verde indicam os resíduos de histidina do sítio ativo e as setas em amarelo indicam os resíduos que coordenam o íon Mg^{2+} .



Fonte: MultAlin.

5.3 Modelagem por homologia

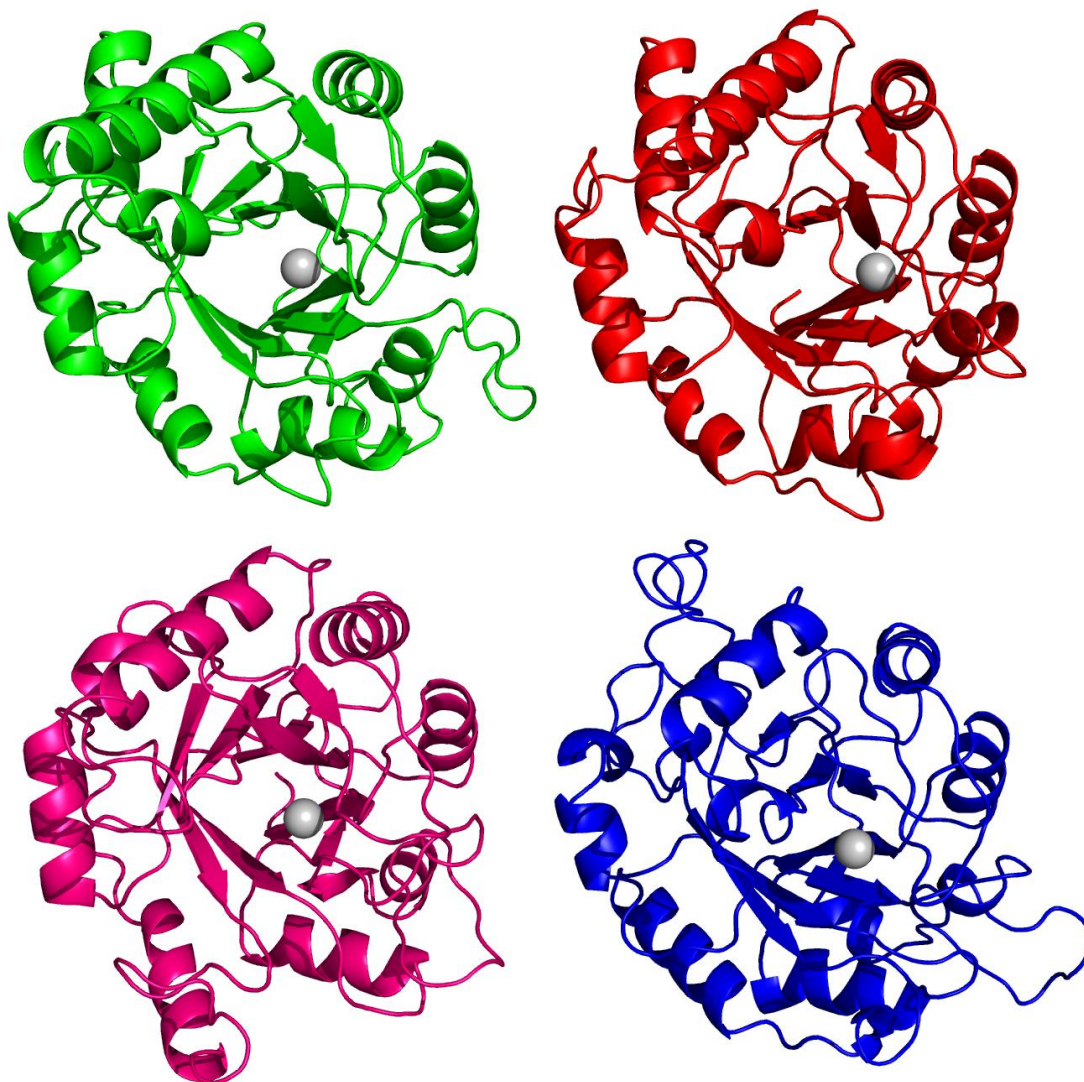
Os modelos das proteínas *C. pseudotuberculosis*, *T. rubrum*, *A. haemolyticum* e *A. chelonae* foram gerados por meio do SWISS-MODEL e todos os modelos usaram a estrutura 4Q6X, com exceção de *T. rubrum*, cujo *template* é o 2F9R, depositados no banco de dados PDB. A tabela abaixo mostra alguns dos valores dos parâmetros fornecidos pelo programa após a construção dos modelos.

Tabela 2: Valores obtidos ao gerar os modelos das proteínas de *C. pseudotuberculosis*, *T. rubrum*, *A. haemolyticum* e *A. chelonae* na ferramenta SWISS MODEL.

Modelos	Templates	Identidade	QMEAN	GMQE
<i>A. chelonae</i>	4Q6X. 1A	23,13%	- 5,50	0,53
<i>A. haemolyticum</i>	4Q6X. 1A	20,66%	- 4,55	0,53
<i>C. pseudotuberculosis</i>	4Q6X.1A	23,90%	- 3,30	0,53
<i>T. rubrum</i>	2F9R.1.A	24,90%	- 4,06	0,52

O GMQE, com valores entre 0 a 1, é a estimaco global do modelo que determina a exatidão e a qualidade da estrutura terciária do modelo gerado. Números mais próximos a 1 indicam um modelo com maior ndice de confiabilidade. Juntamente com o GMQE, analisamos o QMEAN, parâmetro que prevê a qualidade absoluta dos resíduos e da estrutura como um todo que foi gerado com base no modelo utilizado, valores de – 4 ou abaixo indicam um modelo de baixa qualidade. Analisando os resultados da tabela 2 inferimos que a identidade de todos os modelos gerados foi menor que 30%, portanto, esses modelos não são confiáveis. De modo geral, o GMQE apresenta um valor relativamente ruim, pois está um pouco distante de 1 e o QMEAN, com exceção da *T. rubrum*, apresentam valores menores que – 4, logo são exemplares de pouca confiabilidade. Logo, os modelos adquiridos através de modelagem por homologia são imprecisos. Diante desses dados, apenas RMN ou cristalografia podem certificar como a estrutura tridimensional é exatamente. Na figura 7 estão representadas estruturas tridimensionais hipotéticas das SMases D.

Figura 7: Modelos 3D das SMases D de *A. haemolyticum* (vermelho), *A. chelonae* (verde), *T. rubrum* (rosa) e *C. pseudotuberculosis* (azul). O íon magnésio está representado por esfera cinza. Todas as estruturas foram geradas por SWISS-MODEL e analisadas utilizando PyMol (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0, LLC).



Fonte: PyMol

5.4 Ensaios iniciais da expressão em SMases D

Foram realizados testes de expressão em pequena escala com as linhagens BL21 origami 2 e T1 de *Escherichia coli*. Elas foram cultivadas isoladamente em meio líquido seletivo (LB + Kanamicina), mantidas sob agitação, aeração, induzidas com diferentes concentrações de IPTG, diferentes temperaturas (37, 30 e 20 °C) e sonicadas com tampão de lise (50 mM NaHPO₄, 400 mM NaCl, 10 mM imidazol e 10% glicerol) em diferentes pHs, com a presença ou ausência de detergentes a fim de encontrar a condição ideal para produção de SMases D em larga escala na fração solúvel. Após sonicação seguida de centrifugação a 15.000 x g. *A. haemolyticum* (**Fig.**

8) apresentou melhor rendimento em linhagem BL21 origami 2, já *T. rubrum* (**Fig. 9**) *A. chelonae* (**Fig. 10**), *C. pseudotuberculosis* (**Fig. 11**). *T. rubrum* e *A. chelonae* apresentaram melhor expressão na temperatura de indução de 20 °C, *C. pseudotuberculosis* a 30 °C e por fim, *A. haemolyticum* a 37 °C. Todas elas foram induzidas com uma concentração de 0,3 mM de IPTG e com exceção de *A. haemolyticum*, juntamente com o IPTG, foram adicionados 2 mM de MgCl₂. Esses resultados foram confirmados com ensaio de *Western blot*, no qual foi utilizado dois anticorpos, o primeiro foi o Antipoli-histidina, que reconhece a cauda de histidina presentes nas proteínas alvo, e o segundo foi o anti-IgG que reconhece o anticorpo primário. Após a aplicação da mistura BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitroazul de tetrazólio) é possível observar a coloração azul-púrpura apenas quando ocorre a reação antígeno/anticorpo, ou seja, na presença das proteínas alvo. Dessa forma, foi possível constatar que os métodos utilizados para a transformação e expressão das proteínas alvo foram satisfatórios.

Figura 8: *Western blot* de *A. haemolyticum* evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. **(M):** marcador molecular em KDa; **(1):** Linhagem T1, fração total; **(2)** Linhagem Origami 2, fração total; **(3)** Linhagem T1, fração sobrenadante; **(4):** Linhagem Origami 2, fração sobrenadante. Todas em temperatura de 37 °C.

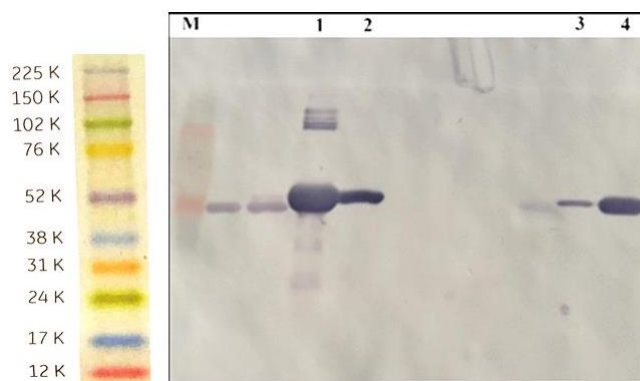


Figura 9: Western blot de *T. rubrum* evidenciando reação específica do anticorpo anti-Histag. Todas expressas em linhagem T1. **(M):** marcador molecular em kDa; **(1):** Fração total, 20 °C, sem detergente; **(2)** Fração total; 20 °C, com detergente; **(3)** Fração total, 30°C sem detergente; **(4):** Fração total, 30° C, com detergente; **(5)** Fração sobrenadante, 20°C, sem detergente; **(6):** Fração sobrenadante, 20 °C, com detergente; **(7):** Fração sobrenadante, 30 °C, sem detergente; **(8):** Fração sobrenadante, 30 °C com detergente.

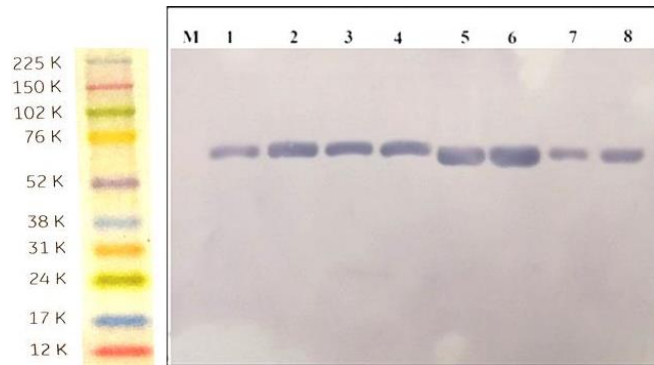


Figura 10: Western blot de *A. chelonae* evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. **(M):** marcador molecular em kDa; **(1):** Linhagem T1, fração total; **(2):** Linhagem T1 sobrenadante. Todas em temperatura de 20 °C.

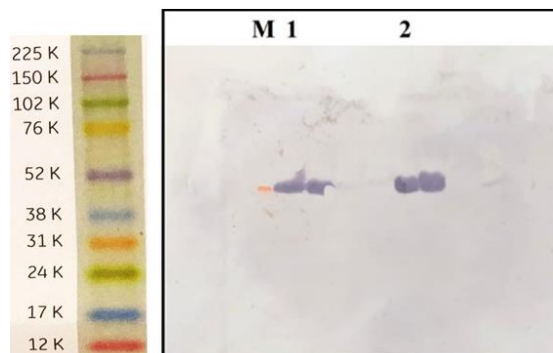
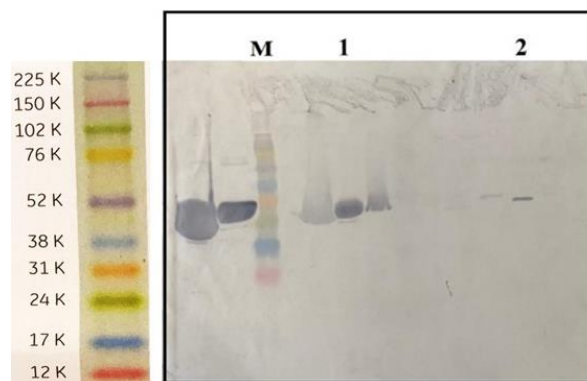


Figura 11: Western blot de *C. pseudotuberculosis* evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. **(M):** marcador molecular em kDa; **(1):** Linhagem T1, fração total; **(2):** Linhagem T1 sobrenadante. Todas em temperatura de 30 °C.



5.5 Expressão em larga escala e purificação

Após o estabelecimento dos protocolos de expressão em pequena escala, as proteínas foram expressas em larga escala conforme o item 4.6. A purificação foi realizada em coluna de níquel e os contaminantes removidos através de lavagens com tampão contendo diferentes concentrações de imidazol (**Tabela 3**), todos os tampões utilizados foram pH 7,7 a uma temperatura de 10 °C, com exceção da *A. chelonae*, cujo tampão de lise foi diferente 20 mM NaHPO₄; 300 mM NaCl; glicerol 10%; 0,5 M imidazol, 1 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 0,5 mM ciclodextrina e o de eluição 20 mM NaHPO₄; 300 mM NaCl; glicerol 30%; 400 mM Imidazol, 1 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, 0,5 mM ciclodextrina, ambos com pH 7 foram diferentes. A purificação foi confirmada por meio de ensaios de SDS-PAGE, no qual os resultados podem ser verificados, para *A. haemolyticum* (**Fig. 12 A**) e *T. rubrum* (**Fig. 12 B**), *A. chelonae* (**Fig. 13**) e *C. psedotuberculosis* (**Fig. 14**). Tendo certeza do sucesso da purificação, as frações puras foram concentradas em dispositivo Millipore (MWCO 10 kDa) e posteriormente, as frações obtidas tiveram suas concentrações medidas por meio do espectrofotômetro UV-Vis, que somente foi possível pois todas as SMases alvo possuem o aminoácido de triptofano em suas sequências, apresentando absorção de luz em 280 nm. Com a obtenção das SMases concentradas, realizou-se outra purificação mais refinada, por gel filtração.

Tabela 3: Tampões utilizados na purificação.

Tampão	Concentração	V/L de cultura
Lise	NaHPO ₄ 20 mM; NaCl 300 mM; Glicerol 10%; imidazol 0,5 M; MgCl ₂ 1 mM	10 mL
Lavagem 1	NaHPO ₄ 20 mM; NaCl 300 mM; Glicerol 10%; imidazol 40 mM, MgCl ₂ 1 mM	10 mL
Lavagem 2	NaHPO ₄ 20 mM; NaCl 300 mM; Glicerol 10%; imidazol 60 mM, MgCl ₂ 1 mM	10 mL
Lavagem 3	NaHPO ₄ 20 mM; NaCl 300 mM; Glicerol 10%; imidazol 80 mM, MgCl ₂ 1 mM	5 mL
Eluição	NaHPO ₄ 500 mM; NaCl 300 mM; Glicerol 10%; imidazol 400 mM, MgCl ₂ 1 mM	10 mL

Figura 12: SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da expressão e purificação das SMases D de *A. haemolyticum* a 37 °C **(A)** e de *T. rubrum* **(B)** a 20 °C na linhagem T1 de *Escherichia coli* através da intensidade das bandas referentes ao produto de purificação utilizando Ni-NTA com diferentes concentrações de imidazol. **(M)**: marcador molecular em (kDa); **(1)**: tampão de lavagem 40 mM; **(2)**: tampão de lavagem 60 mM; **(3)**: tampão de lavagem 80 mM e **(4)**: eluição 400 mM.

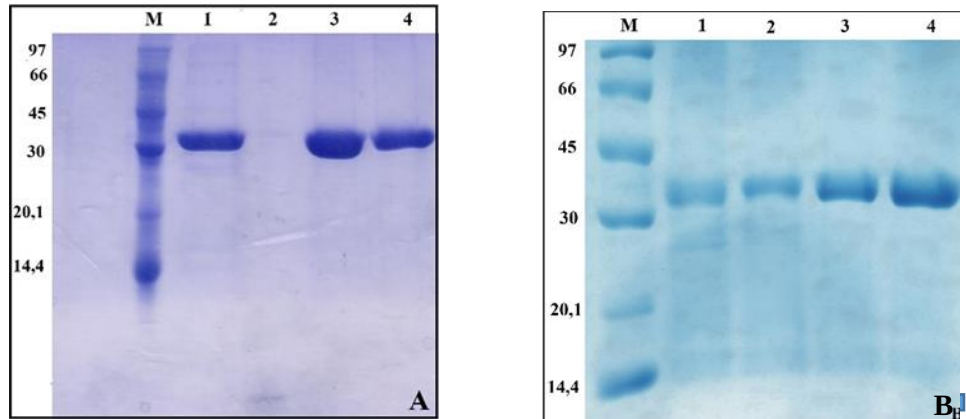


Figura 13: SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da expressão da SMase D de *A. chelonae* a 20 °C na linhagem T1 de *Escherichia coli* através da intensidade das bandas referentes ao produto de purificação utilizando Ni-NTA com diferentes concentrações de imidazol. **(M)**: marcador molecular (kDa); **(1)**: tampão de lavagem 40 mM; **(2)**: tampão de lavagem 60 mM; **(3)**: tampão de lavagem 80 mM e **(4)**: eluição 400 mM.

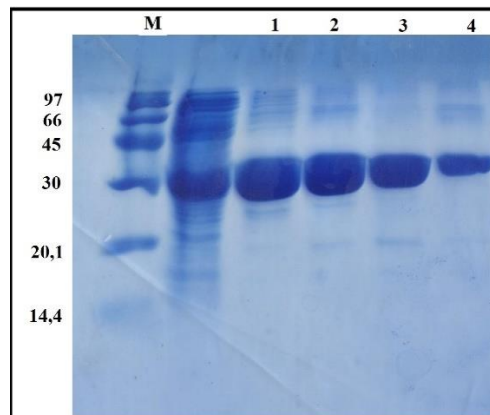
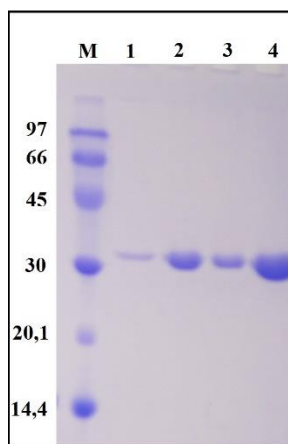


Figura 14: SDS-PAGE 15% evidenciando a eficiência da expressão da SMase D de *C. pseudotuberculosis* a 30 °C na linhagem T1 de *Escherichia coli* através da intensidade das bandas referentes ao produto de purificação utilizando Ni-NTA com diferentes concentrações de imidazol. **(M):** marcador molecular (kDa); **(1):** tampão de lavagem 40 mM; **(2):** tampão de lavagem 60 mM; **(3):** tampão de lavagem 80 mM e **(4):** eluição 400 mM.



5.6 Gel filtração (AKTA-purifier)

Com a finalidade de uma purificação mais refinada e remoção de proteínas agregadas e a troca do tampão contendo imidazol por 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ e pH estabelecido de acordo com o pI de cada proteína (*A. haemolyticum* pH 7,7, *A. chelonae*, *T. rubrum* e *C. pseudotuberculosis* pH 7). A cromatografia de exclusão molecular (gel filtração) foi realizada utilizando-se a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences), loop de 500 µL e fluxo de 0,700 mL/min no sistema AKTA-purifier.

Na exclusão molecular, tem-se a fase móvel que é o tampão e a fase estacionária que é a coluna com resina constituída de esferas porosas. Nessa técnica, as partículas que apresentam massas moleculares maiores, migram livremente pela coluna e são as primeiras frações a serem eluídas. As moléculas menores, por penetrarem nos poros, levam mais tempo para percorrer toda a extensão da coluna, portanto as frações são eluídas mais lentamente. Os cromatogramas da gel filtração foram obtidos utilizando a absorbância de 230 e 280 nm. Em 230 nm é o comprimento de onda no qual é possível identificar as ligações peptídicas dos compostos e em 280 nm alguns resíduos de aminoácidos, como triptofano e tirosina. Nos cromatogramas temos no eixo x as frações em volume de diluição, na qual a amostra será eluída de acordo com seu tamanho molecular, no eixo y temos a concentração da amostra em unidades arbitrárias de absorbância, que é determinada pelos comprimentos de onda de 230 e 280 nm (GROVES et al., 1968; PACE et al., 1995). Após obtenção dos perfis de cromatografia, foram coletadas as frações referentes aos picos de absorbância de 230 e 280 nm e posteriormente essas amostras

foram aplicadas em gel SDS-PAGE para verificar se as amostras eluídas era da SMase D que estava sendo analisada.

Do cromatograma da SMase D de *A. haemolyticum* (**Fig. 15**), foram coletadas as frações 2 a 11, e com base nos resultados obtidos no SDS-PAGE (**Fig. 16**), confirmou-se que era a proteína de interesse que foi purificada, visto que sua massa molecular da *A. haemolyticum* é de 33 kDa. *A. chelonae* (**Fig. 17**) foram coletadas as frações de 3 a 10 e com a posterior confirmação do SDS-PAGE (**Fig. 18**), observamos que a proteína foi purificada e o cromatograma corresponde ao perfil dessa proteína, pois sua massa molecular é de 33 kDa. *C. pseudotuberculosis* (**Fig. 19**) tiveram as frações de 3 a 12 coletadas, a massa molecular dessa SMase D é 33 kDa e por meio do SDS-PAGE (**Fig. 20**), a purificação foi confirmada. Em relação *T. rubrum* (**Fig. 21**), o perfil cromatográfico apresenta duas populações, no entanto, ao coletar as frações 4 a 12 para serem colocadas no SDS-PAGE (**Fig. 22**), demonstrou que a proteína foi purificada e sem contaminantes.

Figura 15: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de *A. haemolyticum* em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume de eluição em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.

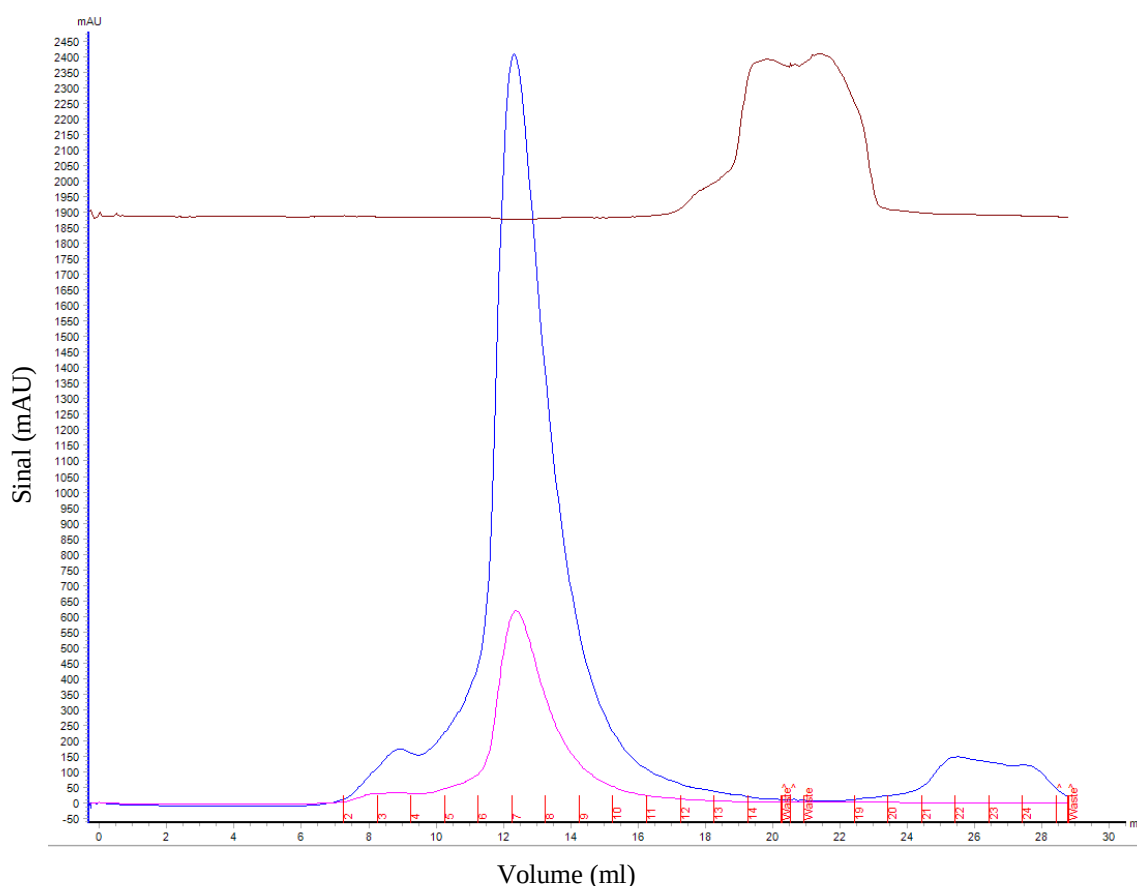


Figura 16: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração da SMase D de *A. haemolyticum*. (M) marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem as frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier.

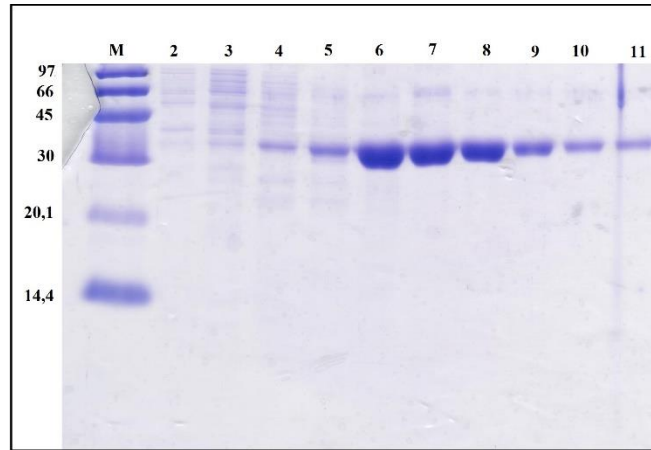


Figura 17: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de *A. chelonae* em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume de eluição em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.

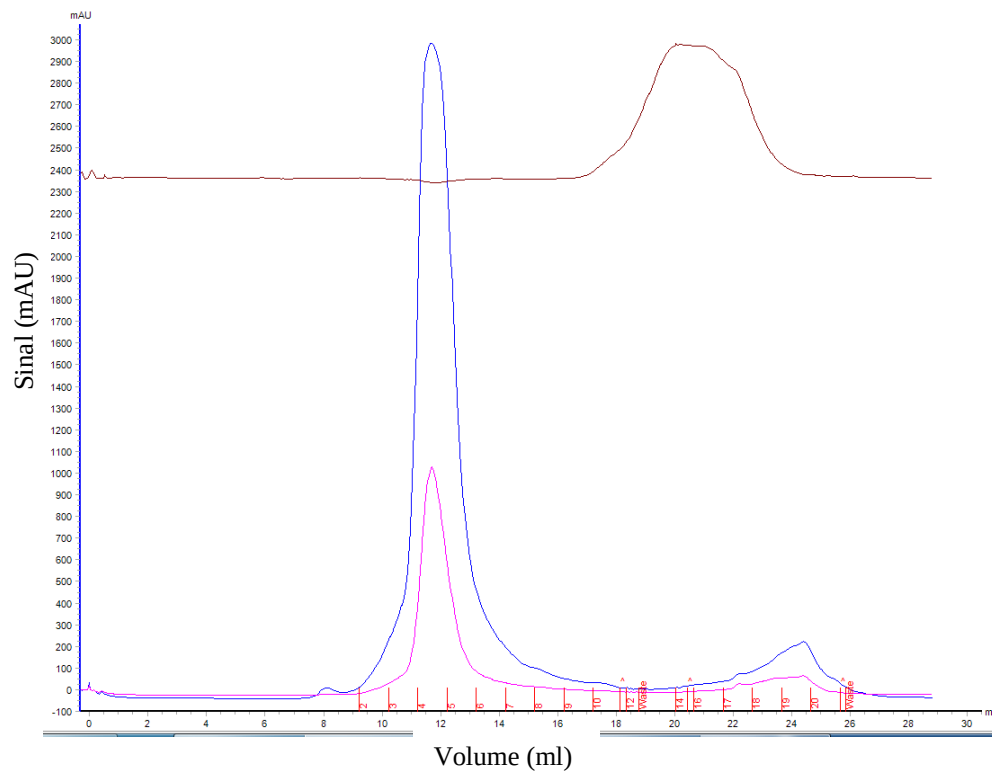


Figura 18: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração da SMase D de *A. chelonae*. **(M)** marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem as frações 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier

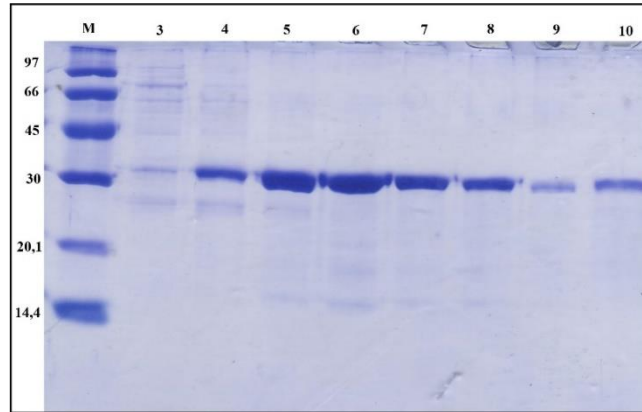


Figura 19: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de *C. pseudotuberculosis* em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.

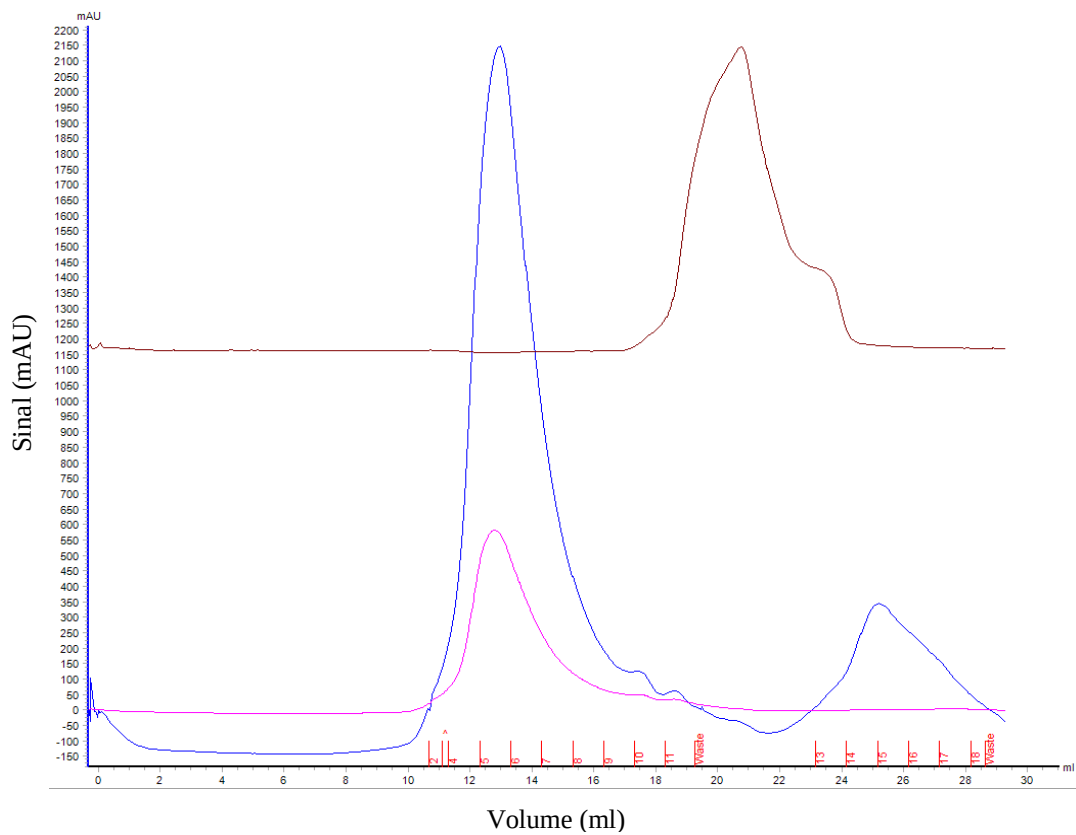


Figura 20: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração da SMase D de *C. pseudotuberculosis* (M) marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem às frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier.

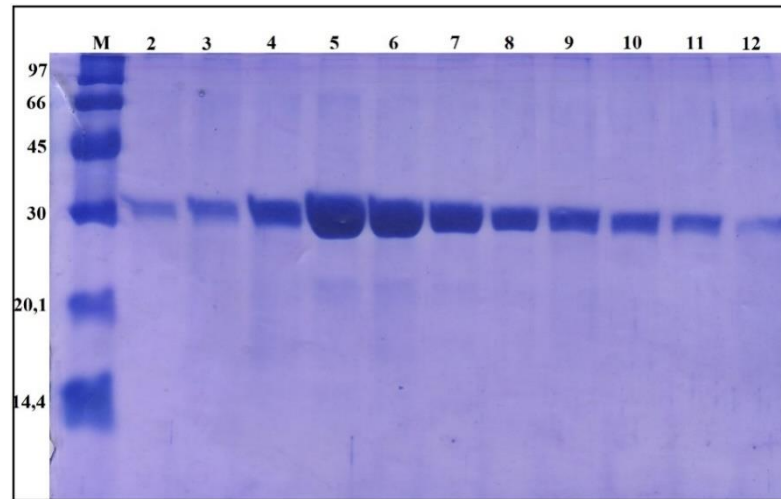


Figura 21: Perfil de cromatografia de exclusão molecular da proteína SMase D de *T. rubrum* em Superdex G75 10/300 (GE) após etapa de purificação em Ni-NTA. O eixo y do gráfico corresponde à absorção em mili unidades de absorbância e o eixo x ao volume de eluição em mililitros. Linha azul indica a absorbância a 230 nm. Linha rosa absorbância em 280 nm. Linha marrom indica a condutividade relacionada à concentração salina.

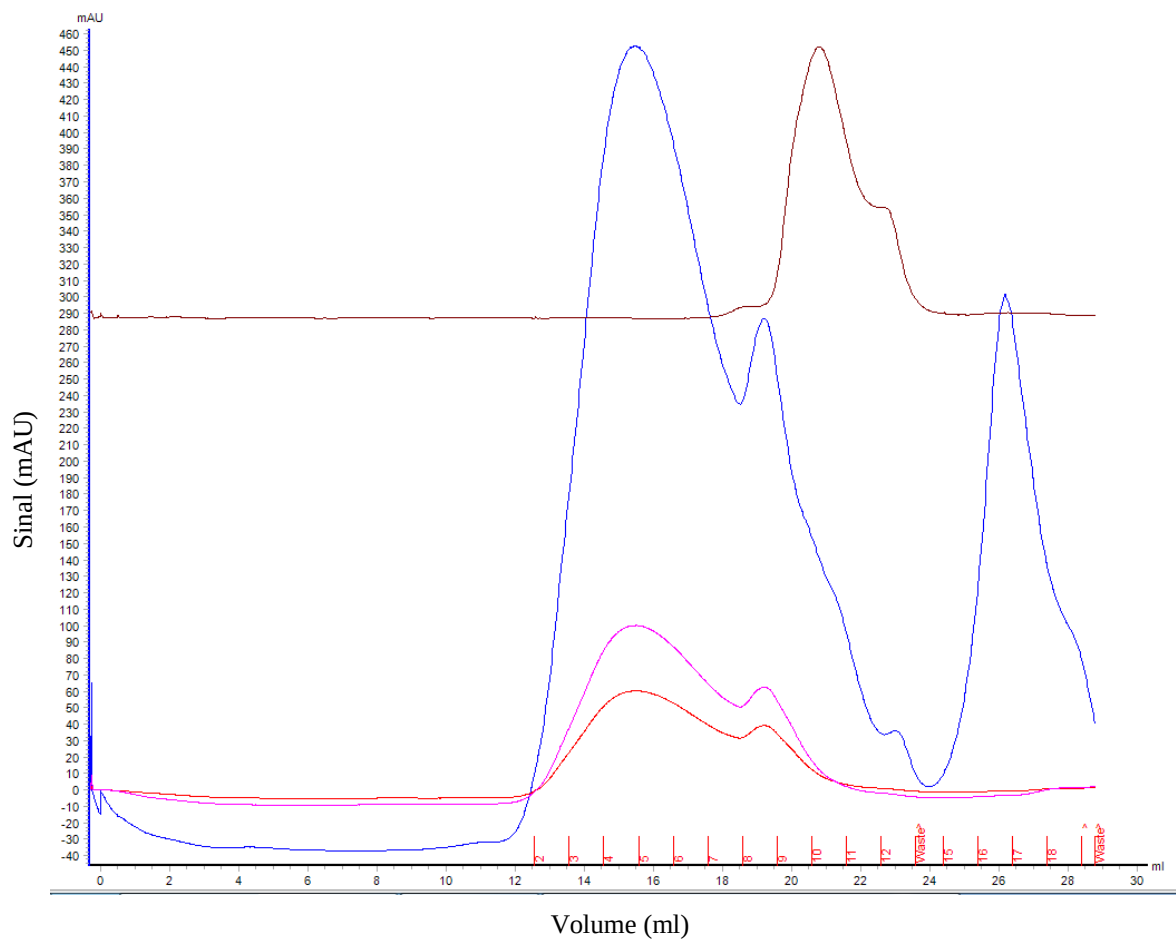
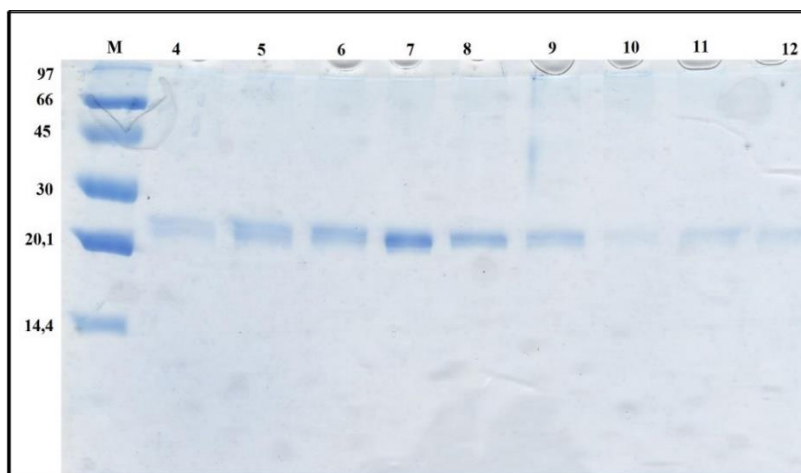


Figura 22: SDS-PAGE 15% com as frações coletadas após a gel filtração de *C. pseudotuberculosis* (**M**) marcador molecular em (kDa) e as outras bandas correspondem as frações 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 obtidas na gel filtração pelo sistema AKTA-purifier.



As SMases D de *A. chelona* e *A. haemolyticum* foram detectadas próximas ao volume 12 mL da coluna com picos relativamente estreitos, os quais são ideais para ensaios de cristalização. Já a SMase D de *C. pseudotuberculosis* apresentou um pico mais amplo horizontalmente próximo ao volume 14 mL. Na exclusão molecular da *T. rubrum*, o pico no cromatograma ficou muito amplo, o que não é ideal para ensaios cristalográficos. Diversas condições de tamponamento, em diferentes pHs e na presença de aditivos foram testadas para obtenção de um perfil cromatográfico mais refinado. Entre os aditivos, foram testados betaciclodextrina, β -mercaptonetanol, DTT e N-Laurilsarcosina.

5.7 Análises por espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Para as análises em DLS, foi utilizado o tampão 100 mM NaCl, 10 mM NaHPO₄ e pH 7,7. As cubetas utilizadas foram de quartzo com 1 centímetro de caminho óptico, no qual foi adicionado 300 μ L e mais 10 μ L de cada SMase D em uma concentração de 2 mg/mL. Para a SMase D *T. rubrum*, foi necessária uma análise adicional com a utilização do tampão 20 mM MES pH 5,5.

Figura 23: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de *A. chelonae*.

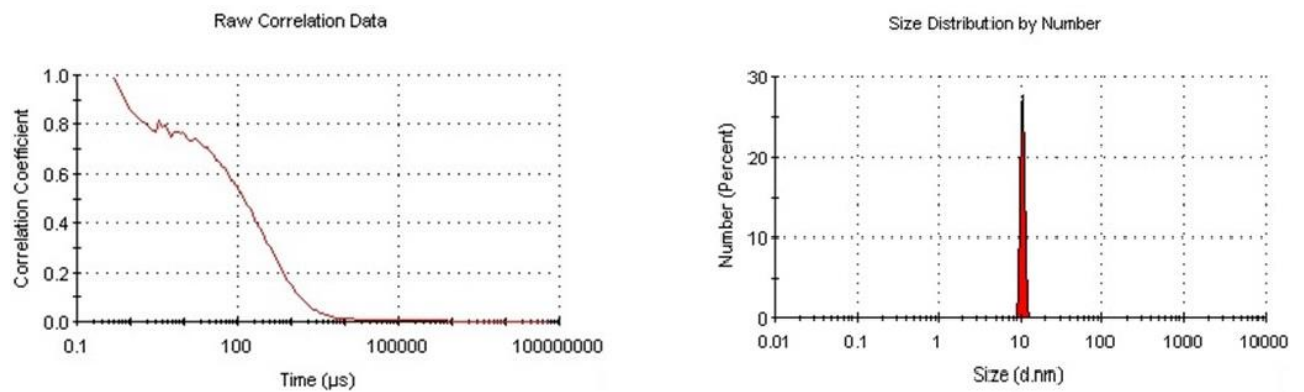


Figura 24: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de *A. haemolyticum*.

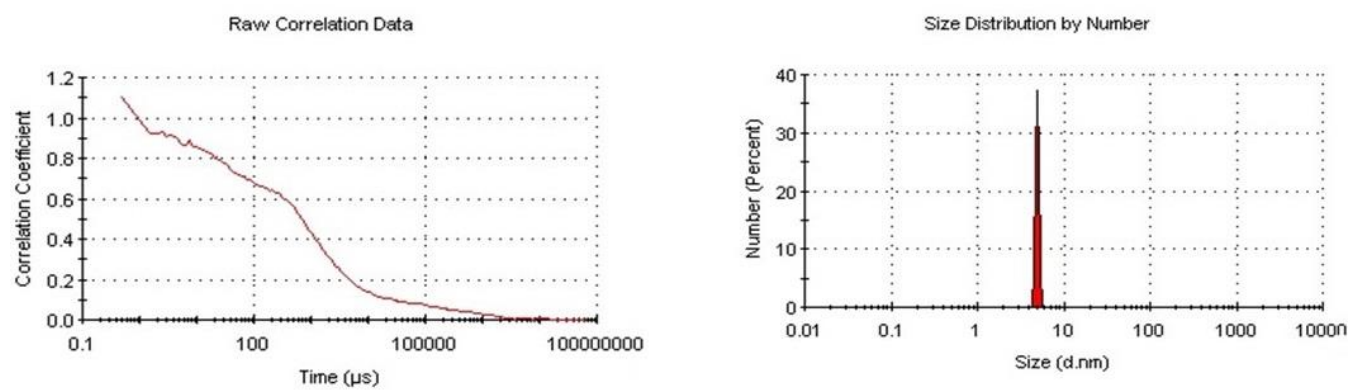


Figura 25: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de *C. pseudotuberculosis*.

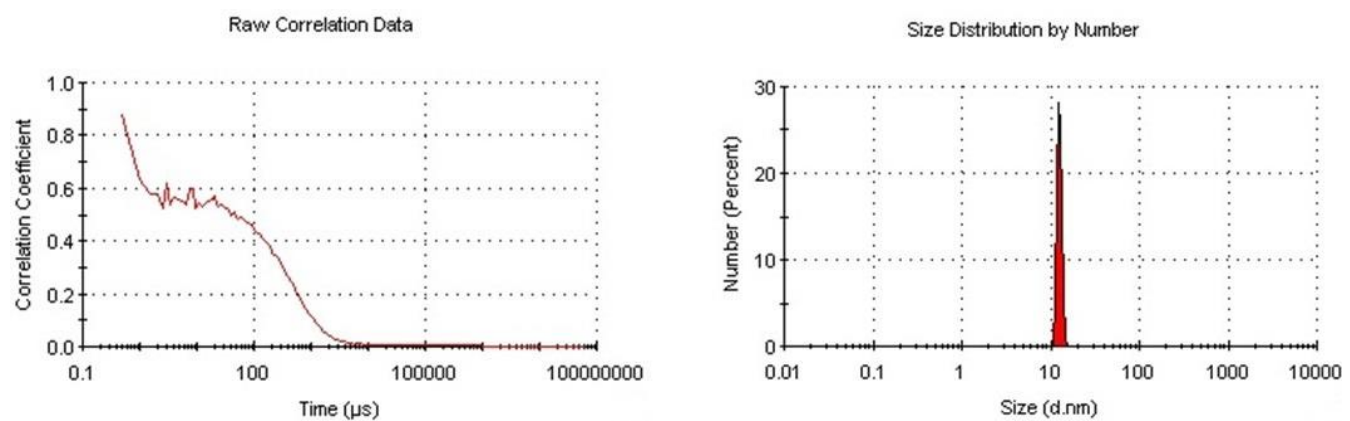


Figura 26: Análise dos gráficos de coeficiente de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de *T. rubrum*.

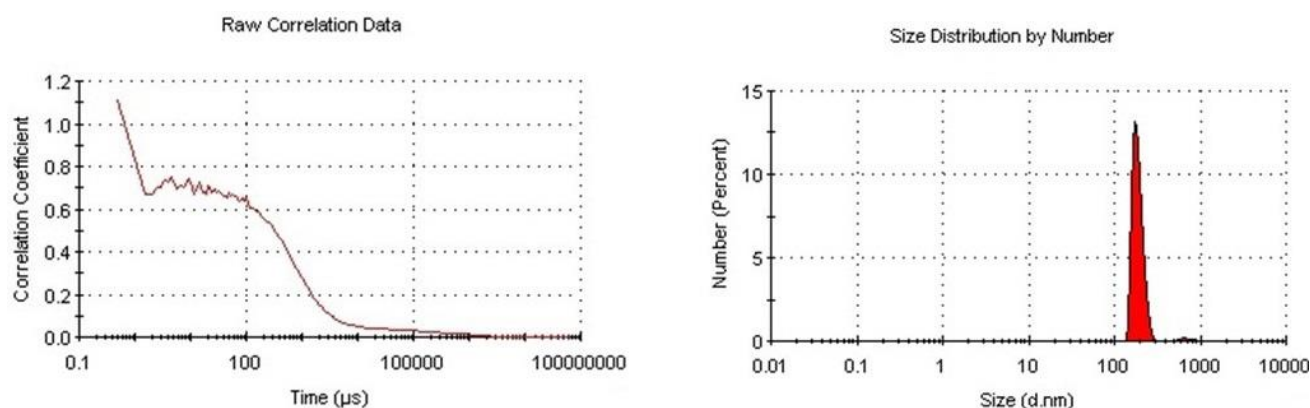
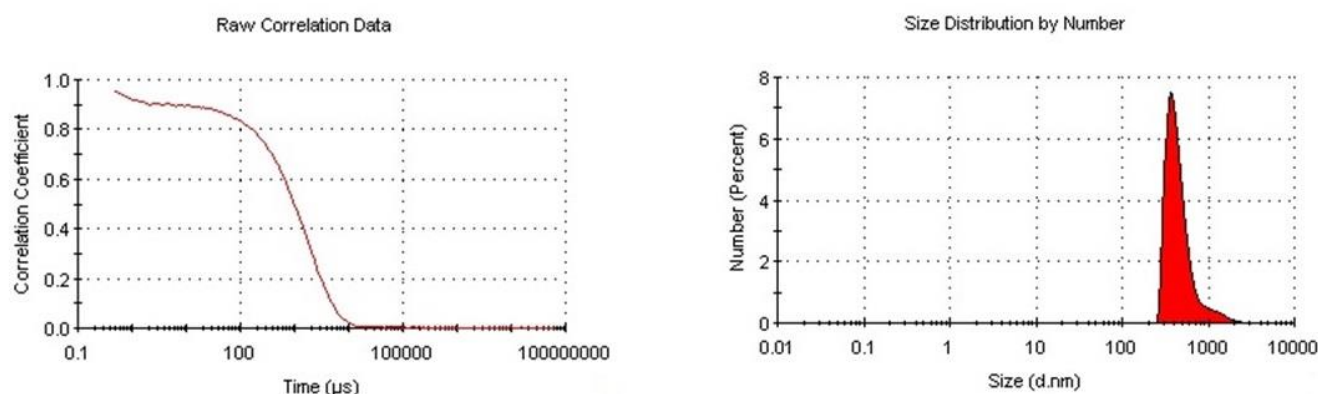


Figura 27: Análise dos gráficos de correlação e dispersividade em DLS das SMases D de *T. rubrum* em tampão 20 mM MES pH 5,5.

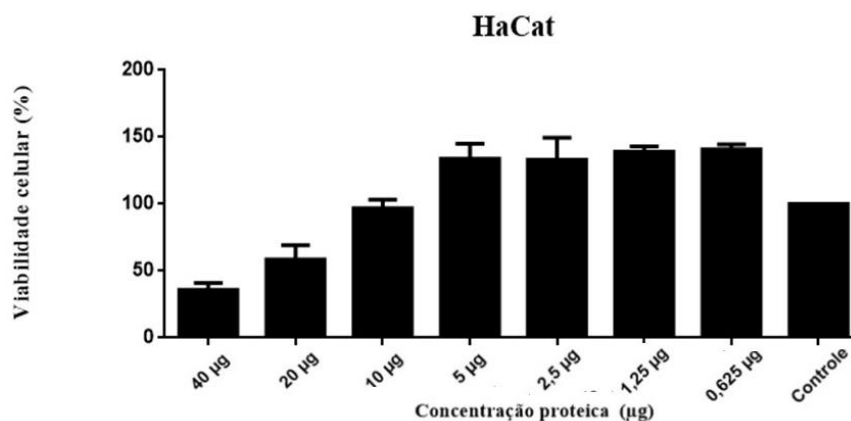


Os resultados de DLS indicam populações monomodais para as SMases D de *A. chelonae* (**Fig. 23**) e *C. pseudotuberculosis* (**Fig. 24**), corroborados pelos picos únicos e estreitos em gel filtração. A SMase D de *T. rubrum* (**Fig. 25 e 26**) apresenta um perfil de agregado em DLS com massa molecular maior que a esperada para SMase D, no entanto, com base na espessura do pico cromatográfico, apresenta-se multidispersa em gel filtração (**Fig. 21**) e indicando populações com uma massa molecular menor que a esperada, uma vez que o pico se projeta para a direita. A SMase D de *A. haemolyticum* (**Fig. 24**) aparenta ser monomodal, o que corrobora com seu perfil cromatográfico oriundo da gel filtração por exclusão molecular, que apresenta apenas um pico. As proteínas *C. pseudotuberculosis* e *T. rubrum* (**Fig. 19 e 21**), foram eluídas também após o sal, indicando que pode haver interação entre a resina e a proteína de forma que ela migre mais lentamente do que o esperado.

5.8 Ensaios de viabilidade celular (MTT)

Inicialmente as SMases D de *A. chelonae*, *A. haemolyticum*, *C. pseudotuberculosis* e *T. rubrum* tiveram a viabilidade celular testadas em ensaios de MTT em linhagem celular HaCaT. A SMase D de *A. chelonae* foi a única que apresentou resultados satisfatórios estatisticamente em relação a sua viabilidade celular quando comparada com o controle. Foi observada uma diminuição dose dependente, uma vez que com ao diminuir as concentrações, a viabilidade celular aumentou, ou seja, as células foram morrendo em uma porcentagem menor, no período de 72 horas. Os resultados significativos utilizando as SMases D de *A. chelonae* foram obtidos com as amostras contendo 40, 20, 1,25 e 0,625 µg, no entanto somente com 40 e 20 µg foram observadas diminuições da viabilidade celular (**Fig. 28**).

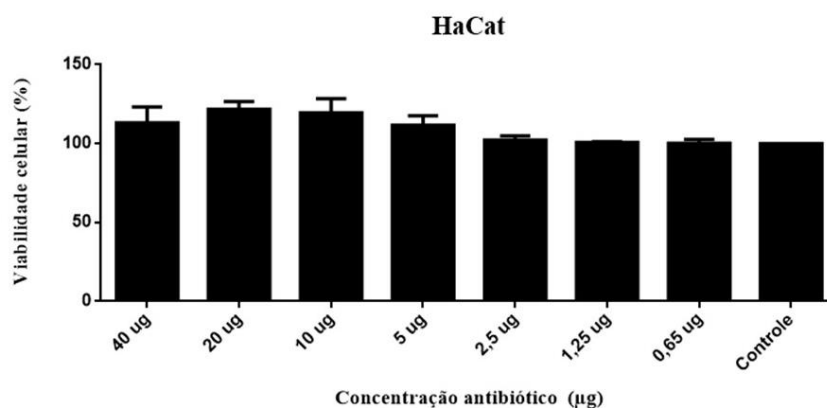
Figura 28: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT da SMase D de *A. chelonae* após 72 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$.



Fonte: produção própria

O candidato a inibidor doxíciclina não diminuiu a viabilidade celular das células em relação ao controle (**Fig. 29**).

Figura 29: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com o inibidor doxíciclina nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$.

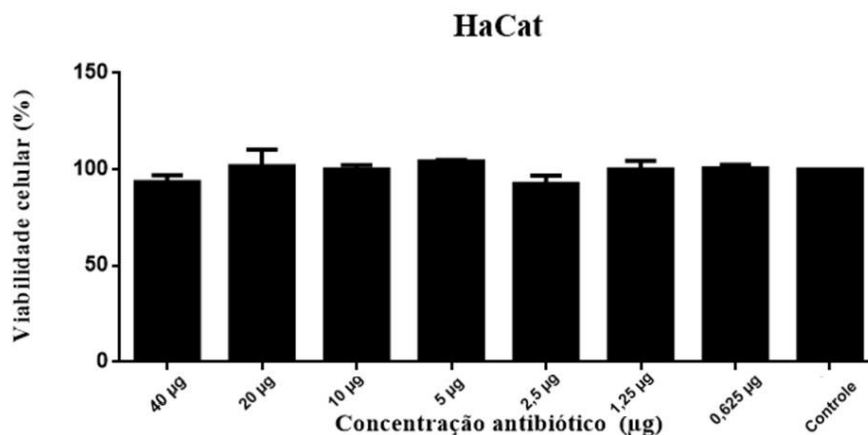


Fonte: produção própria

A figura 30 indica também diferença significativa com relação ao controle, quando se utilizam 20 e 10 µg de doxíciclina, sugerindo aumento na taxa de crescimento celular, mas nas outras concentrações, temos um resultado insignificante estaticamente, o que indica que o inibidor realmente não influencia a viabilidade celular.

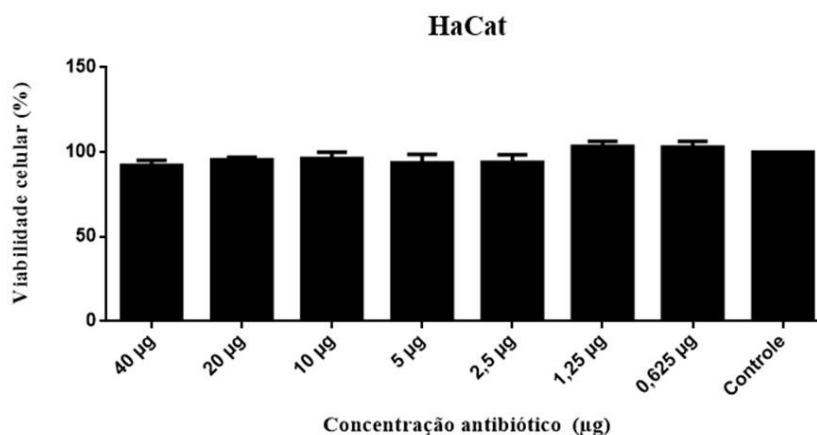
Os candidatos a inibidores lapachol (**Fig. 30**) e tetraciclina (**Fig. 31**) também foram comparados com o controle e não houve diminuição da viabilidade celular, logo não apresentou diferença significativa relevante.

Figura 30: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com o inibidor lapachol nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 μg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$.



Fonte: produção própria

Figura 31: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com o inibidor tetraciclina após 96 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 μg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$.

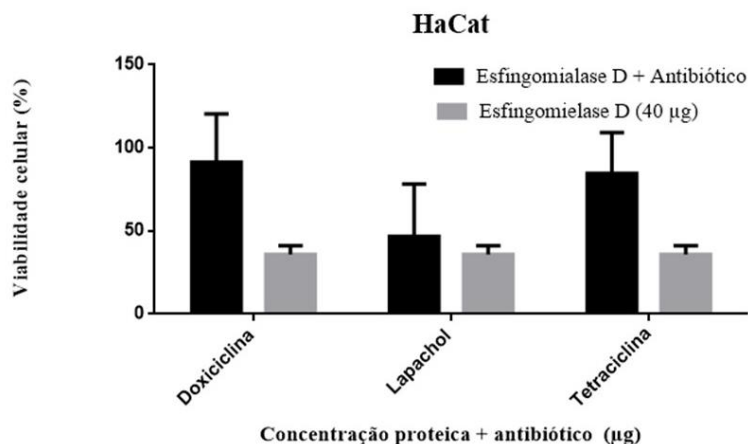


Fonte: produção própria

Por apresentar resultados indicando diminuição da viabilidade celular na presença da SMase D de *A. chelonae* com relação ao controle, foram testados possíveis complexos de SMases D e os candidatos a inibidores doxíciclina, lapachol e tetraciclina em ensaios de MTT em linhagens de células HaCaT. Para esse fim, tanto a SMase D quanto os inibidores foram testados na concentração de 40 μg . Todos os possíveis complexos inibidores-esfingomielinase comparados com a SMase D de *A. chelonae* exibiram resultados significantes. Quando a enzima é incubada com o antibiótico e esse possível complexo é testado em ensaios de MTT, a

viabilidade celular aumenta no caso da SMase D de *A. chelonae*, ou seja, os antibióticos realmente inibem a atividade SMase D. Entre todos os inibidores, o que apresenta maior probabilidade de ser um futuro alvo contra SMase D é a doxíciclina (**Fig. 32**).

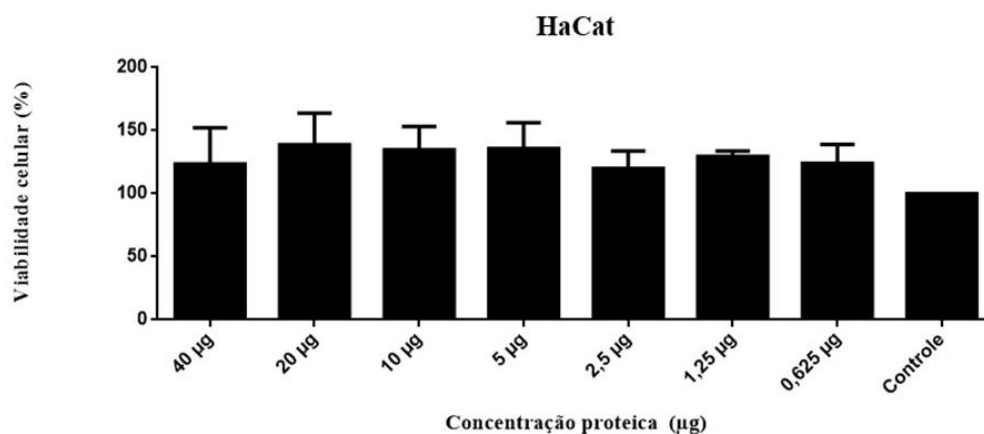
Figura 32: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT com a esfingomielinase D de *A. chelonae* complexada com seus inibidores tetraciclina, doxíciclina e lapachol após 96 horas de incubação na concentração 40 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$.



Fonte: produção própria

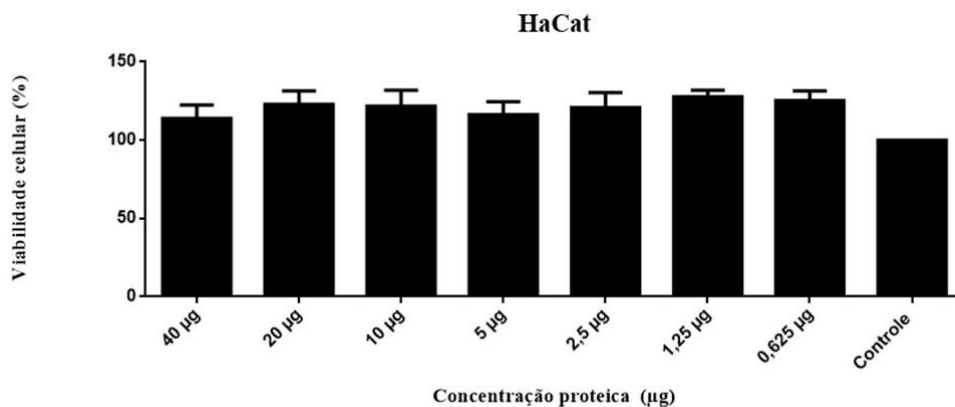
Foram testadas também as viabilidades celulares na presença das SMases D de *C. pseudotuberculosis* (**Fig. 33**) e *A. haemolyticum* (**Fig.34**), mas para esses alvos não foram testados os possíveis complexos enzima-inibidor, pois ambas não apresentaram resultados relevantes em relação ao controle, indicando que não ocorreu diminuição da viabilidade celular como seria o esperado.

Figura 33: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT da SMase D de *C. pseudotuberculosis* após 72 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$.



Fonte: produção própria

Figura 34: Ensaio MTT para análise da viabilidade celular em células da linhagem HaCaT da SMase D de *A. haemolyticum* após 72 horas de incubação nas concentrações 40, 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625 µg expressas no eixo X e a viabilidade (células vivas) em % no eixo Y. $P < 0,05$.



Fonte: produção própria

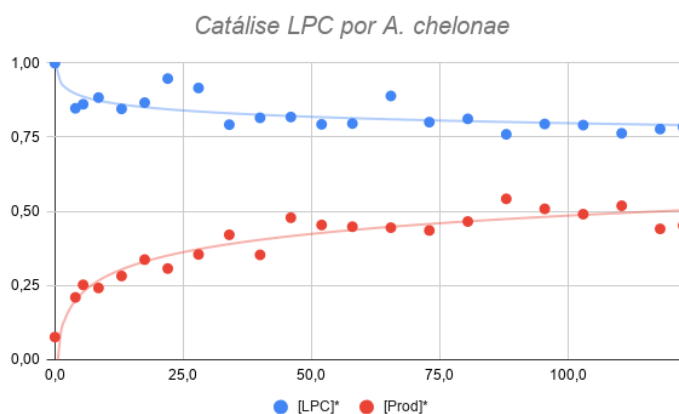
A figura 34 indica que a comparação entre as concentrações 20, 10, 2,5 e 0,625 µg de Smase D de *A. haemolyticum* com seu controle, existe uma diferença estatística significativa na viabilidade celular. Essa diferença não foi devido à diminuição da viabilidade celular, mas relacionada ao aumento da taxa de crescimento celular, assim como demonstrado também na figura 29.

5.9 Catálise enzimática

Na catalise enzimática temos a presença de um substrato sendo consumido até a formação de um produto. A adição de uma enzima pode proporcionar diminuição da energia de ativação e assim a velocidade da reação é acelerada. Nesse processo o substrato, que no caso é a LPC, se liga a enzima- SMase D em seu sítio ativo e como consequência forma o produto que é desacoplado da SMase D (COOPER, 2000). Para que a atividade enzimática da SMase D ocorra, teoricamente, é necessário a presença do íon Mg^{2+} em seu sítio catalítico (MURAKAMI., et al 2005 e 2006).

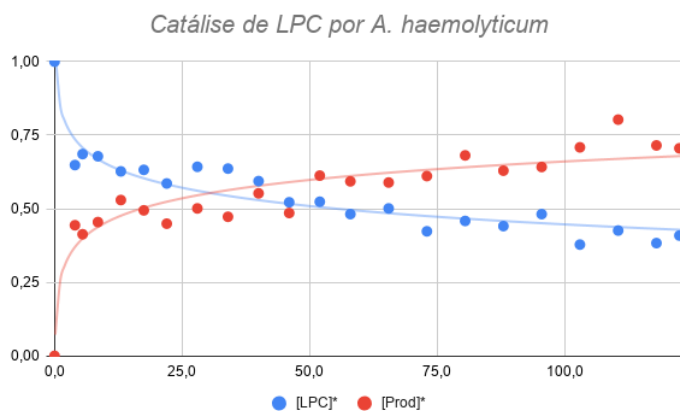
A atividade catalítica das SMases D de *A. chelonae*, *A. haemolyticum*, *C. pseudotuberculosis* e *T. rubrum*, foram comparadas de acordo com seu tempo de formação do produto e o consumo do LPC em relação as suas concentrações foram monitoradas por meio de RMN. Em todas as catálises, o LPC começa com uma concentração de 1 mM no tempo zero e a partir dos 4 minutos de experimento começa o seu consumo. Na figura 35, o LPC começa a ser consumido em 4 minutos com uma concentração de 0,85 mM. Em relação à formação do produto, aos 4 min de experimento a concentração é de 0,21 mM e um aumento expressivo de sua concentração ocorre por volta de 52 min. No final de 2 horas a concentração do produto é de 0,78 mM enquanto que a de LPC é 0,45 mM.

Figura 35: Análise das triplicadas do espectro de *A. chelonae*. Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).



Fonte: produção própria

Figura 36: Análise das triplicadas do espectro de *A. haemolyticum*. Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).

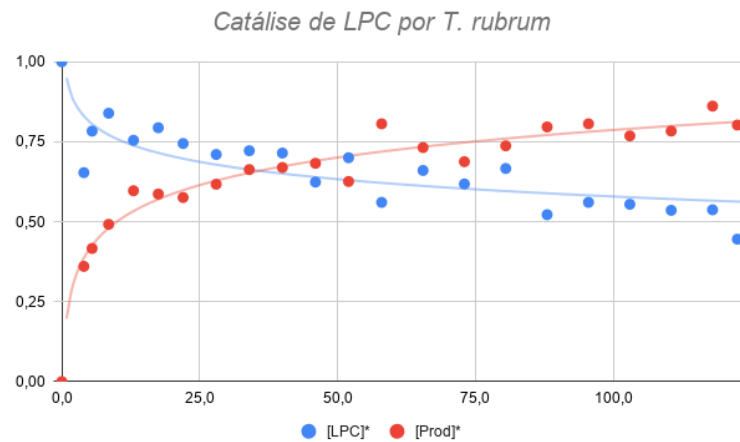


Fonte: produção própria

Na catálise da SMase D de *A. haemolyticum* (**Fig. 36**), o LPC começa a ser consumido em 4 minutos a uma concentração de 0,65 mM e o gráfico indica que em 58 minutos há um decaimento mais brusco e a concentração se mantém aproximadamente constante ao fim de 2 horas. O produto começa a ser produzido em 4 minutos a uma concentração de 0,44 mM e tem sua maior concentração (**Fig. 36**) entre 46 e 58 minutos e sua taxa de formação também está relativamente constante até o fim do experimento. Após 2 horas de experimento o LPC atinge uma concentração de 0,41 mM e o produto atinge 0,71 mM.

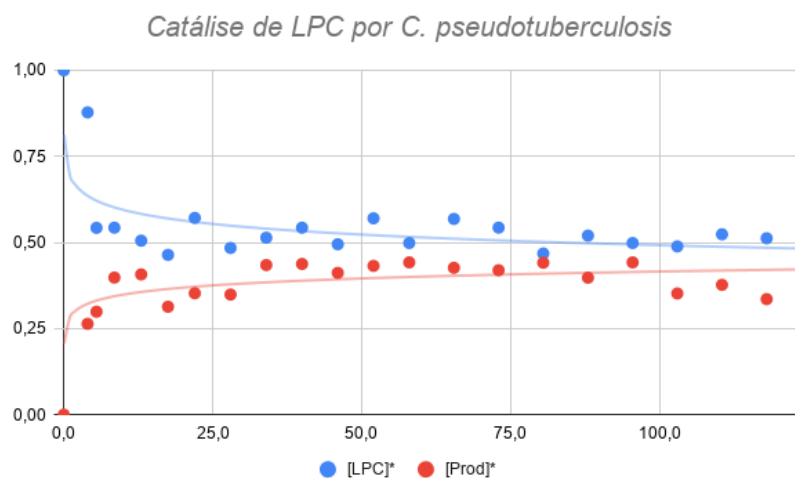
No ensaio contendo Smase D de *T. rubrum* (**Fig. 37**), aos 4 minutos existe uma concentração de 0,65 mM de LPC e 0,36 mM de produto formado. Ao final de 2 horas, a concentração do LPC é de 0,45 mM e a do produto formado é 0,80 mM.

Figura 37: Análise das triplicadas do espectro de *T. rubrum*. Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).



Fonte: produção própria

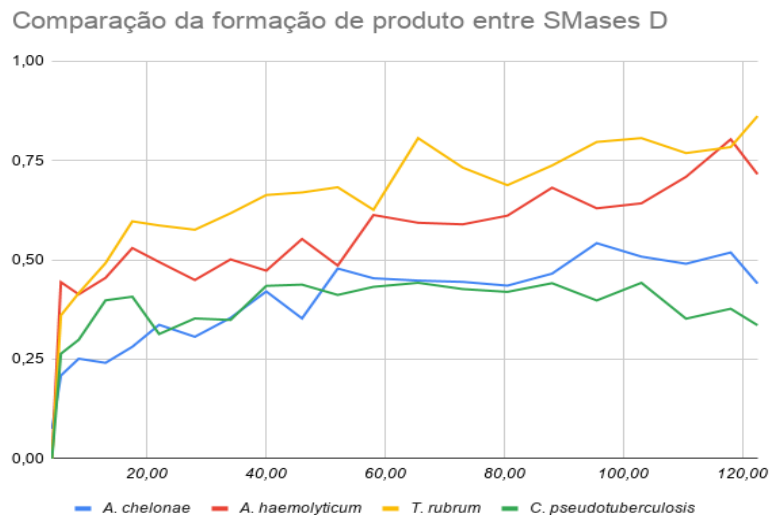
Figura 38: Análise das triplicadas do espectro de *C. pseudotuberculosis*. Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).



Fonte: produção própria

Ao analisar o gráfico da figura 38, o decaimento da concentração do LPC começa em 4 min com uma concentração de 0,88 mM. A formação do produto também começa aos 4 min e sua concentração é 0,26 mM. Com 2 horas de experimento rodado, a concentração final do LPC é 0,51 mM e a do produto 0,34 mM.

Figura 39: Comparação da catálise das SMases D de *A. cheloniae* (azul), *A. haemolyticum* (vermelho), *T. rubrum* (amarelo) e *C. pseudotuberculosis* (verde) em relação a formação do produto. Eixo x representa o tempo (min) e o y a concentração (mM).



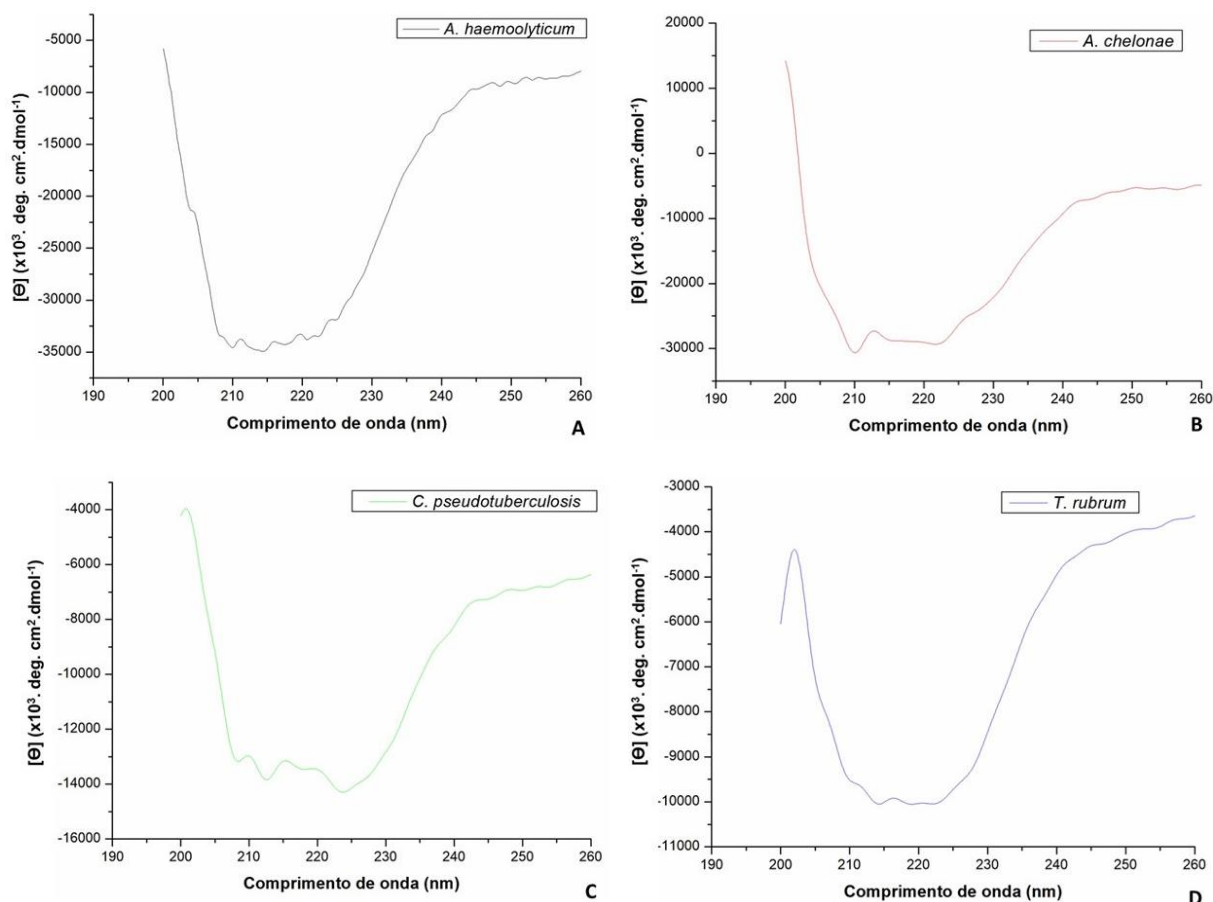
Fonte: produção própria.

Os gráficos da catálise enzimática dessas quatro SMases D apresentam um padrão muito semelhante. Após 2 horas de experimento, *C. pseudotuberculosis* (**Fig. 38**) ainda tem 0,51 mM de LPC consumido, enquanto nas outras SMases D essa concentração é menor. O ensaio de catálise em que ocorre uma maior formação de produto após as 2 horas de experimento é o da SMase D de *T. rubrum* (**Fig. 39**). A mais demorada é a catálise da *C. pseudotuberculosis* (**Fig. 39**), uma vez que mesmo após 2 horas de experimento, ela apresenta apenas uma concentração de 0,34 mM de formação de produto.

5.10 Dicroísmo Circular

Após a coleta dos espectros no CD, foi realizada a deconvolução pelo *software* CDpro e plotagem dos gráficos pelo OriginLab.

Figura 40: Espectro do dicroísmo circular das SMases D **(A):** *A. haemolyticum*, **(B):** *A. chelonae*, **(C):** *C. pseudotuberculosis* e **(D):** *T. rubrum*.



Fonte: produção própria

A. haemolyticum (**Fig. 40 A**) apresenta em sua conformação secundária 31 % de voltas e 51 % desordenadas. *A. chelonae* (**Fig. 40 B**) apresenta de voltas e 62,7 % desordenadas. *C. pseudotuberculosis* (**Fig. 40 C**) 22,3 % de voltas e 63,2 % desordenadas. *T. rubrum* (**Fig. 40 D**) 13,5 % de voltas e 8,1 % desordenadas. Esses dados sugerem que as proteínas não estão estruturadas e como a análise foi comprometida por ruídos durante coleta de dados e deve ser refeita utilizando proteínas mais concentradas.

6 Conclusão

Na natureza existe uma gama de organismos que possuem a proteína SMase D e a maioria tem como característica serem patogênicos, no entanto são poucas as estruturas cristalográficas resolvidas dessas proteínas. Nesse estudo foram analisados os mecanismos de citotoxicidade na presença de possíveis inibidores e análise comparativa da catálise enzimática dessas enzimas.

Nesse trabalho foram também estabelecidos os protocolos de expressão e purificação das SMases de *A. chelonae*, *A. haemolyticum*, *C. pseudotuberculosis* e *T. rubrum* com detalhes sobre os estados oligoméricos durante as etapas de purificação. Foi possível ainda encontrar um possível alvo terapêutico, a doxiciclina. Análises de RMN indicaram que embora essas enzimas apresentem baixas similaridades sequenciais entre elas, apresentam um padrão muito semelhante em suas catálises enzimáticas.

Por meio da modelagem por homologia apresentada na tabela 2, concluímos não ser possível a obtenção de uma estrutura tridimensional confiável e dessa forma, seriam necessários os ensaios de cristalografia e de RMN para a resolução das suas estruturas.

A compilação de todos esses dados, incluindo as análises feitas no DLS, indica que essas proteínas apresentam padrões diferentes relativos à oligomerização, à catálise e à citotoxicidade em células da linhagem HaCaT.

Referências

- ALBANESI, C., et al. Keratinocytes in inflammatory skin diseases. **Current Drug Target - Inflammation & Allergy**; 4(3):329–334, 2005.
- ALVES F.S. F; SANTIAGO L.B &; PINHEIRO R.R. Linfadenite caseosa: o estado da arte. Documentos, **Embrapa Caprinos, Sobral**; 60, 2007.
- AL-GAABARY, M.H; OSMAN, S.A; OREIBY A.F. Caseous lymphadenitis in sheep and goats: Clinical, epidemiological and preventive studies. **Small Rumin. Res**; 87(1): 116-121, 2009.
- ÂNGULO, J., et al. Ligand-receptor binding affinities from saturation transfer difference (STD) NMR spectroscopy: The binding isotherm of STD initial growth rates. **Chemistry** 16:7803–7812, 2010.
- AUBIN G.G., et al. Two Family members with skin infection due to *Dermatophilus congolensis*: a case report and literature review. **Eur J Dermatol** 26: 621– 622, 2016.
- AZEVEDO, J. L. Genética de Microrganismos. Goiânia: UFG, 1998.
- AZEVEDO, W. F. Cristalização de macromoléculas biológicas. Laboratório de Sistemas Biomoleculares. **Departamento de Física-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP**, São José do Rio Preto. SP, 2004.
- BAIRD, G.J; FONTAINE, M.C. *Corynebacterium pseudotuberculosis* and its role in ovine caseous lymphadenitis. **J Comp Pathol**; 137: 179-210, 2007.
- BARONI, A., et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**; 30(3):257–262, 2012.
- BERNHEIMER, A.W., et al. Comparative toxinology of *Loxosceles reclusa* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Science**.228:590–1, 1985.
- BORDEN, P; HELLER, RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**; 7 (1-2):159-78, 1997.
- BOUKAMP, P., et al. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **The Journal of Cell Biology**; 106(3):761–771, 1988.
- BOUWSTRA, J.A; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochim Biophys Acta**; 1758(12):2080-95, 2006.
- CARLSON, P., et al. Biotypes of *Arcanobacterium haemolyticum*. **J Clin Microbiol**; 32:1654-57, 1994.
- CHAIM, O.M., et al. Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicol App l Pharmacol** 211: 64–77, 2006.
- CHATTERJEE, S. Neutral sphingomyelinase: past, present and future. **Chemistry and Physics of Lipids** 102 79–96, 1999.

COLLINS, M.D., et al. Reclassification of *Corynebacterium haemolyticum* in the genus *Arcanobacterium* gen. nov. *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev., comb. nov. **J Gen Microbiol.** 1982; 128:1279–81, 1982.

COOPER, G.M. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. The Central Role of Enzymes as Biological Catalysts. Sunderland (MA): **Sinauer Associates**, 2000.

CUEVAS, W.A., SONGER; J.G. *Arcanobacterium haemolyticum* phospholipase D is genetically and functionally similar to *Corynebacterium pseudotuberculosis* phospholipase D. **Infect Immun.** 61:4310–6, 1993.

CUETO, R, Light Scattering: What you can and cannot get from it?. Polymere Analysis Lab, 2015.

DE SANTI FERRARA, G.I., et al. SMase II, a new sphingomyelinase D from *Loxosceles laeta* venom gland: molecular cloning, expression, function and structural analysis. **Toxicon** 53, 743–753, 2009.

DIAS-LOPES., et al. Identification of New Sphingomyelinases D in Pathogenic Fungi and Other Pathogenic Organisms. **PloS One.** 8(11): e79240, 2013.

DURBIN, S. D.; FEHER, G. Protein Crystallization. **Annual Reviews of Physical Chemistry**, v. 47, p. 171-204, 1996.

FLORES-DIAS, M., et al. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. **Microbiol Mol Biol Rev.** Sep; 80(3): 597–628, 2016.

FONTAINE, M. C.; BAIRD, G. J. Caseous lymphadenitis. **Small Ruminant Research**; 76(1): 42-48, 2008.

GARCÍA-RUÍZ, J. M. Nucleation of Protein Crystals. **Journal of Structural Biology**, v. 142, p. 22-31, 2003.

GASTON, D.A., ZUROWSKI, S.M. *Arcanobacterium haemolyticum* pharyngitis exanthem. **Arch Dermatol**; 132:61–4, 1996.

GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America (Araneae: Scytodidae). **Bulletin of American Museum of Natural History** 136:119-183, 1967.

GOLIATT, C.Z.V. Predição de Estrutura 3D de Proteínas por Técnicas de Modelagem Comparativa. V **Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos LNCC – Petrópolis**, 2010.

GOÑI, F. M.; ALONSO, A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. **FEBS Letters**, v. 531, p. 38-46, 2002.

GEBREYOHANNES, M. An overview on dermatophilosis of animals. **Journal of Animal Science Advances**; 3:337–344, 2013.

GROVES, W.E., et al. Spectrophotometric determination of microgram quantities of protein without nucleic acid interference. **Anal. Biochem**, 22 (2). 195-210, 1968.

GUPTA, A.K., SUMMERBELL, R.C. Tinea capitis. **Med Mycol.** 38: 255-278, 2000.

HANEL, K. H., et al. Cytokines and the skin barrier. **International Journal of Molecular Sciences**; 14(4):6720–6745, 2013.

HAMADA, M., et al. *Mobilicoccus pelagius* gen. nov., sp. nov., and *Piscicoccus intestinalis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family Dermatophilaceae, and reclassification of *Dermatophilus chelonae* (Masters et al. 1995) as *Austwickia chelonae* gen. nov., comb. nov. **Journal of General & Applied Microbiology** 56:427–436, 2010.

HARD, G.C., Electron microscopy examination of *Corynebacterium ovis*. **J. Bacteriol**; 97:1480–1485, 1969.

HEALTHY CHILDREN. Disponível em: <<https://www.healthychildren.org/English/healthissues/conditions/infections/Pages/Arcanobacterium-Haemolyticum-Infections.aspx>>. Acesso em 14 de março de 2018.

HELLER, RA; PARKS, WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biol** ;26(8):587–596, 2007

HUBE, B., et al. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. **Microbiology**. Apr; 147(Pt 4):879-89, 2001.

KEEL, T. The application of in situ AFM to the study of molecular and macromolecular crystallization. **PhD thesis**, University of Nottingham, 2004.

KIRK, P., et al. Dictionary of Fungi 10a ed. **CABI Publishing**, Wallingford. 771p, 2008.

LEE, S., LYNCH, K. R. Brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) venom phospholipase D (PLD) generates lysophosphatidic acid (LPA). **Biochem J** 391: 317–323, 2005.

LIU, D. T. L., et al. An infected hydrogel buckle with *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **British Journal of Ophthalmology**; 89:238- 251, 2005.

LUCAS, E. A., et al. Phospholipase D promotes *Arcanobacterium haemolyticum* adhesion via lipid raft remodeling and host cell death following bacterial invasion. **BMC Microbiol**. Oct 25; 10:270, 2010.

MACKENZIE, A., et al. Incidence and pathogenicity of *Arcanobacterium haemolyticum* during a 2-year study in Ottawa. **Clin Infect Dis**. Jul 21(1):177-81, 1995.

MADIGAN, T.M., et al. Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: **ArtMed**, 2016.

MASTERS, A.M., et al. *Dermatophilus chelonae* sp. nov., isolated from chelonids in Australia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 45:50–56, 1995.

MCPHERSON, A. Crystallization of biological molecules. New York: **CSHL Press**, 1999.

MEHTA, C.L. *Arcanobacterium haemolyticum*. **J Am Acad Dermatol**; 48:298-9, 2003.

MILLER, R.A., BRANCATO, F., HOLMES, K.K. *Corynebacterium haemolyticum* as a cause of pharyngitis and scarlatiniform rash in young adults. **Ann Intern Med**. 105:867-872, 1986.

MILLS, A. E; MITCHELL, R. D; LIM, E. K. *Corynebacterium pseudotuberculosis* is a cause of human necrotising granulomatous lymphadenitis. **Pathology**; 29: 231-233, 1997.

MIYAMOTO, H., et al. Bacteriological characteristics of *Arcanobacterium haemolyticum* isolated from seven patients with skin and soft-tissue infections. **J Med Microbiol.** Apr. 64 (Pt 4):369-74, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65(1-2), 55–63, 1983.

MURAKAMI, M. T. et al. Structural Basis for Metal Ion Coordination and the Catalytic Mechanism of Sphingomyelinases D. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13658 –13664, 2005.

MURAKAMI, M. T. et al. Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 342, p. 323-329, 2006.

NAIRN, M. E; ROBERTSON, J. P; MCQUADE, N. C. The control of caseous lymphadenitis in sheep by vaccination *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Australian Veterinary Association**, 1977.

NEIMAN, A.M. Prospore membrane formation defines a developmentally regulated branch of the secretory pathway in yeast. **J Cell Biol.** Jan 12; 140(1):29-37, 1998.

NELSON, D., COX, M. Princípios Fundamentais da Bioquímica de Lehninger. 5º ed. Porto Alegre. **ArtMed**, 2011.

OLSON, M.E., et al. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics, Can. **J. Vet. Res**; 66: 86–92, 2002.

PACE, C.N., et al. “How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.” **Protein science: a publication of the Protein Society** vol. 4, 11: 2411-23, 1995.

PARMAR, S. A., MUSCHOL, M. Hydration and Hydrodynamic Interactions of Lysozyme: Effects of Chaotropic versus Kosmotropic Ions, **Biophys J.** Jul 22; 97(2): 590–598, 2009.

PAULE, B.J., et al., Experimental *Corynebacterium pseudotuberculosis* primary infection in goats: kinetics of IgG and interferon production, IgG avidity and antigen recognition by *Western blotting*. **Vet Immunol Immunopathol**; 96: 129-39, 2003.

PECHKOVA, E.; et al. Groelcrystal growth and characterization. **Biosystems.** Roma, p.223-227, 2008.

PECHKOVA, E.; NICOLINI, C. From art to science in protein crystallization by means of thin-film nanotechnology. **Nanotechnology** 13, 460–464, 2002.

PEEL, M.M., et al., Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. **Clin Infect Dis.** 24: 185-91, 1997.

PIONTKOWSKI, M.D; SHIVVERS, D.W. Evaluation of a commercially available vaccine against *Corynebacterium pseudotuberculosis* for use in sheep. **J. Am. Vet. Med. Assoc**; 212:1765–1768, 1998.

ROSE, K., et al. Phospholipase D signaling is essential for meiosis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** Dec 19; 92(26):12151-5, 1995.

- SALYERS, A., WITT, D. Virulence factors that damage the host. In: Salyers A, Witt D, editors. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, D.C.: **ASM Press**; pp. 47–62, 1994.
- SALYERS, A., WITT, D. Virulence factors that promote colonization. In: Salyers A, Witt D, editors. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. Washington, D.C.: **ASM Press**; pp. 30–46, 1994.
- SAMET, D., BARENHOLZ, Y. Characterization of acidic and neutral sphingomyelinase activities in crude extracts of HL-60 cells. *Chemistry and Physics of Lipids* 102 65–77, 1999.
- SEEBACHER, C., BOUCHARA, J.P., MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**.166:335-52, 2008.
- SCHMIEL, D.H., MILLER, V.L. Bacterial phospholipases and pathogenesis. **Microbes Infect.** Nov; 1(13):1103-12, 1999.
- SCHURER, N., et al. Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. **Experimental Dermatolog**; 2(4):179–185, 1993.
- SONGER, J.G. Bacterial phospholipases and their role in virulence. **Trends Microbiol.** Apr; 5(4):156-61, 1997.
- SONGER, J. Glenn et al. Biochemical and genetic characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **American journal of veterinary research**, 49, 2: 223-226, 1988.
- SOUCEK, A., SOUCKOVA, A. Toxicity of bacterial sphingomyelinases D. **J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol**.18:71-79, 1974.
- SOUZA, MARIA de F. et al., Linfadenite caseosa em ovinos deslanados abatidos em um frigorífico da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 31, 3: 224-230, 2011.
- SREERAMA, N.; WOODY R. W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem*, 2000.
- SUNG T. C., et al. Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. **EMBO J.** 16: 4519–4530, 1997.
- TITBALL, R.W. Bacterial phospholipases. **Symp Ser Soc Appl Microbiol.** 27:127S-137S, 1998.
- TOMPKINS, L.S. *Corynebacterium haemolyticum*. **Clin Microbiol News.** 5: 29-30, 1983.
- ULLAH, A.; et al. Structure of a novel class II phospholipase D: Catalytic cleft is modified by a disulphide bridge. **Biochemical and Biophysical Research Communications** (Print), v. 409, p. 622-627, 2011.
- WAITE, M. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes. **Elsevier Science B.V**, 1996.
- WEITZMAN, I., SUMMERBELL, R.C. The dermatophytes. **Clin. Microbiol. Reviews.** 8: 240-259, 1995.
- VYAS, V. K., et al. Homology Modeling a Fast Tool for Drug Discovery: Current Perspectives, **Indian J Pharm Sci**; 74(1): 1–17, 2012.

Apêndice A- Outros experimentos

Além da expressão das SMases D de *A. chelonae*, *A. haemolyticum*, *C. pseudotuberculosis* e *T. rubrum*, também foram testados protocolos de expressão e purificação das SMases D de *Aspergillus flavus* e *Galendromus occidentalis*. As sequências de aminoácidos que codificam essas SMases D estão evidenciadas abaixo, com destaque para a cauda de histina em amarelo, sítio de clivagem para TEV protease em cinza.

SMase D de *Aspergillus flavus*

MGSSHHHHHHENLYFQGYAIAHRVLRNEAVTAALSHGANALEVDLTAWYFGWWA
DHDGKLFSAGSTARDLFKFIAQKQWTKDYNISFVWLDIKNPDFCRKGRPCSIEALRDL
AREILEPAGIRVLYGFFETAESRGFKVIRDGLNSNEAVVLSGETSTILHLYNISGAGIPV
KQMVMDFGDSWLRKGVDIYPELRYGSWKRDHGKLGKVFSWTSAQGDTEMVRYLL
REAGIDGLIYGYQTDEYNDKSGPKSALKDIVDFVEAHSDTHRMATEDDAPW

SMase D de *Galendromus occidentalis*

MGSSHHHHHHENLYFQGRITDERSGDIRRPFYIIAHMANSIPTMDLFLREGANAVELD
VTFEPNGAAWWVHHGVPCDYFRVCHESQLVDYLQAAATRNLIFLDLKSYSKLSPE
AKEFAGVDLALKLSGHFFDKGGQQTNNVLSVPYVTEKQLLASFIEKMKSLKPEQLSK
ISYDVSENPDFS SVGKMFRDLNVTSAWQGDGVTNWFEFPRGFSRVRDAVELRDQGN
VYIKKVYRWTVDYKGHIRQLIDLIDGVMNTNPSRAYQVVRDLKEIRLAGKKDNIN
DIFSL

Foram realizados testes de expressão e purificação em pequena escala, com variações na temperatura (20 e 30 °C), com a presença e ausência de N-Laurilsarcosina e diferentes pHs. Conforme a figura demonstrado na figura 40, foi possível expressar a SMase D de *A. flavus*, a qual foi localizada na fração total, mas não foi possível encontrar um protocolo para obtenção da proteína expressa em sua fração solúvel. A SMase D de *G. occidentalis* também foi expressa e localizada em sua fração total e no sobrenadante a expressão não foi significativa mesmo tentando diversos protocolos.

Figura 41: Western blot das SMases D de *A. flavus* e *G. occidentalis* evidenciando a reação específica do anticorpo anti-Histag. **(C):** controle, **(M):** marcador molecular em (kDa); **(1):** Linhagem T1 em *E. coli*, fração total de *A. flavus*; **(2)** LinhagemT1 em *E. coli*, fração total de *G. occidentalis*; **(3)** Linhagem T1 em *E. coli*, fração sobrenadante de *A. flavus*; **(4):** Linhagem T1 em *E. coli*, fração sobrenadante de *G. occidentalis*. Todas em temperatura de 30 °C.

